



Universidade de Aveiro
2005

Departamento de Biologia

Débora Silvestre
Gonçalves Rodrigues **Genes-alvo para os androgénios na gónada da**
dourada, *Sparus auratus*.



Universidade de Aveiro
2005

Departamento de Biologia

Débora Silvestre
Gonçalves Rodrigues **Genes-alvo para os androgénios na gónada da**
dourada, *Sparus auratus*.

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica da Prof. Doutora Sílvia Cristina da Cruz Marques Socorro e co-orientação do Prof. Doutor José Eduardo Brites Cavaco, Professores Auxiliares na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade da Beira Interior.

o júri

presidente

Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares

Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

Doutor Adelino Vicente Mendonça Canário

Professor Catedrático da Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente da Universidade do Algarve

Doutora Sílvia Cristina da Cruz Marques Socorro

Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior

Doutor José Eduardo Brites Cavaco

Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior

agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Sílvia Socorro, pela proposta do tema do trabalho, pela orientação científica e pelo apoio e incentivo dados ao longo da realização deste trabalho.

Agradeço ao Professor Doutor João Queiroz a oportunidade concedida de realizar este trabalho no Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade da Beira Interior.

Agradeço ao Centro de Ciências do Mar da Universidade do Algarve, pela disponibilização dos animais e das instalações.

Agradeço ao Professor Doutor Adelino Canário, pela execução dos radioimunoensaios no seu laboratório.

Agradeço à Dra. Patrícia Pinto pelas sequências dos primers para os receptores de estrogénios.

Um agradecimento especial à colega e amiga Ana Clara, pelo apoio, paciência e carinho inestimáveis que tanta força me deram e que muito contribuíram para que fosse possível atingir esta meta.

Aos colegas Susana, Telma e Henrique, um agradecimento pela ajuda, conselhos e principalmente pelo excelente ambiente de trabalho.

Ao meu pai, o maior agradecimento de todos, pela força, pelo incentivo, pelo carinho e compreensão imensuráveis ao longo de todos estes anos.

À Dra Manuela, à Marcela e à Dra. Conceição, um agradecimento especial pela compreensão demonstrada, pelo apoio, pela paciência e pelo incentivo dados todos os dias.

Um agradecimento especial à Inês, ao Gonçalo, ao Tiago e a todos os amigos, que, de uma maneira ou de outra, nunca me deixaram desistir.

palavras-chave

peixes, diferenciação sexual, inversão sexual, 11-cetotestosterona, receptores de esteróides, genes diferencialmente expressos.

resumo

Na maioria dos vertebrados, como os mamíferos e os pássaros, o sexo é determinado pelos cromossomas, ao passo que noutras espécies, como os peixes e os répteis, a diferenciação sexual é influenciada pelo meio ambiente. Está estabelecido que os esteróides sexuais desempenham um papel importante nessa diferenciação, assim como na maturação sexual e no comportamento dos vertebrados, incluindo os peixes. Ao longo dos anos tem sido demonstrado que a administração de androgénios induz a masculinização das gónadas, o que demonstra o envolvimento destes esteróides no desenvolvimento do testículo. Estudos de estimulação com androgénios em peixes têm indicado, entre outros efeitos, que estes estimulam a espermatogénese. No entanto, se do ponto de vista fisiológico estes processos estão relativamente bem documentados, poucos estudos têm visado estudar as alterações genéticas verificadas em resposta ao tratamento com androgénios. Em consequência, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos na acção dos androgénios. O objectivo do presente estudo é contribuir para a elucidação desses mecanismos através da identificação de genes diferencialmente expressos em resposta aos androgénios na gónada da dourada e do estudo da expressão do receptor de androgénios (AR) e dos receptores de estrogénios (ER α , ER β 1 e ER β 2) na gónada em resposta ao tratamento com 11-cetotestosterona (11KT), o potente androgénio existente nos peixes. A dourada (*Sparus auratus*) é um peixe teleósteo hermafrodita protândrico, apresentando uma gónada mista durante o segundo ano de vida. A estimulação de exemplares desta espécie, com cerca de um ano de idade, com 11KT (10 mg/kg peso corporal) levou a um aumento da proporção do testículo na gónada, assim como do índice gonadosomático. Estas respostas morfológicas foram acompanhadas por alterações ao nível molecular, tendo-se isolado através da técnica de hibridação subtractiva diversos genes diferencialmente expressos em resposta ao tratamento com 11KT; esses genes estão ligados à síntese e secreção de proteínas estruturais e a diversas vias metabólicas. A expressão dos receptores na gónada, em resposta à administração de 11KT, foi avaliada pela técnica de RT-PCR semi-quantitativa; a expressão dos receptores hormonais (AR, ER α , ER β 1 e ER β 2) não sofreu alterações, nem em resposta à estimulação hormonal, nem em função da percentagem de testículo na gónada. Deste modo podemos concluir que a análise da expressão dos receptores de esteróides sexuais não é uma boa ferramenta molecular para estudar a diferenciação e/ou inversão sexual, sugerindo-se a análise da expressão de enzimas esteroideogénicas e, eventualmente de outros genes novos que ainda estão por identificar e que provavelmente terão crucial importância na diferenciação e/ou desenvolvimento das gónadas. Os resultados produzidos no presente estudo fornecem informação que pode servir de base para a definição de investigação futura e sugerem novas pistas sobre as vias moleculares envolvidas na actuação dos androgénios.

keywords

fish, sexual differentiation, sexual inversion, 11-ketotestosterone, steroid receptors, differential expressed genes.

abstract

In most vertebrates such mammals and birds, sex is determined by sex chromosomes; in other species such as fish and reptiles, sex is not fixed in the zygote, but sexual differentiation can be influenced by the local environment. It is well established that sexual steroids play an important role in vertebrate's sexual differentiation, sexual maturation and behaviour. Several studies demonstrate that, in teleosts fishes, androgens promote masculinization of the gonads and stimulation of spermatogenesis. From a physiological point of view these processes are well documented; nevertheless, the studies envisaging the genetic changes caused by androgen treatment are scarce or inexistent; therefore, little is known about the molecular mechanisms underlying androgens actions in gonads. The purpose of this study is to contribute to elucidate those mechanisms through the identification of androgen responsive genes in seabream gonad and to study the expression of the androgen receptor (AR) and estrogen receptors (ER α , ER β 1 and ER β 2) in response to 11-ketotestosterone (11KT) administration, a potent androgen in fishes. The seabream (*Sparus auratus*) is a teleost protandic hermaphrodite with an ovotestis during the second year of life. Treatment with 11KT induced a raise in the gonadosomatic index and an increase in the testicular proportion of the gonad. These morphologic changes were accompanied by molecular alterations. A cDNA subtractive hybridization allowed to isolate several genes that were up-regulated by 11KT; the identified genes can be classified into several groups, including protein synthesis and secretion, and metabolism. The expression of receptors in the gonad was estimated by semi-quantitative RT-PCR; the expression of AR, ER α , ER β 1 and ER β 2 doesn't change in response to hormonal alteration neither with the proportion of testis in the gonad. In this way, we can conclude that the analysis of the steroid receptors expression is not a good molecular tool to study the differentiation and/or sexual inversion and we suggest the analysis of steroidogenic enzymes and, eventually, new genes that remain unidentified and may have a key role in differentiation and development of the gonads. The results obtained in the present study provide information that can be helpful in defining future research and give some new clues on the molecular pathways involved in steroid mechanisms of action.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	viii
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xi
I. Introdução geral e objectivos	1
II. Androgénios, estrogénios e seus receptores	4
1. Androgénios: locais de síntese, locais de acção e função biológica	5
2. Estrogénios: locais de síntese, locais de acção e função biológica	9
3. Receptor de androgénios e receptores de estrogénios	11
3.1. A superfamília dos receptores nucleares	11
3.2. Estrutura proteica	12
3.3. Modo de actuação	14
4. Genes diferencialmente expressos em resposta aos androgénios	17
III. Material e métodos	23
1. Metodologias gerais	24
1.1. Algumas considerações sobre segurança	24
1.2. Experiência de tratamento com 11-cetotestosterona	24
1.2.1 Animais	24
1.2.2. Amostragem	25
1.2.3. Determinação dos níveis plasmáticos de 11-cetotestosterona e de estradiol	26
1.2.4. Determinação do índice gonadossomático	26
1.2.5. Determinação da proporção de testículo na gónada	26
1.3 Extracção do RNA total	27
1.4 Electroforese em gel de agarose	27
1.5 Síntese de cDNA	28
1.6 Reacção em cadeia da polimerase (PCR)	29
1.7 Clonagem de cDNA e produtos de PCR	29
1.8 Sequenciação e análise de sequências	31
1.9 Purificação de RNA poli (A) ⁺	31
2. Identificação de genes diferencialmente expressos em resposta aos androgénios no testículo	32

2.1. Construção do banco de cDNA subtraído	32
2.2. Clonagem e identificação dos genes diferencialmente expressos	34
2.3. Confirmação da expressão diferencial dos genes	35
3. Análise da expressão do receptor de androgénios e dos receptores de estrogénios em resposta ao tratamento com 11-cetotestosterona	38
3.1. PCR semi-quantitativo	38
IV. Resultados	40
1. Efeito do tratamento com 11-cetotestosterona	41
1.1. Níveis plasmáticos de 11-cetotestosterona e estradiol	41
1.2. Índice gonadossomático	41
1.3. Proporção de testículo na gónada	42
2. Identificação de genes diferencialmente expressos	43
3. Expressão do receptor de androgénios e dos receptores de estrogénios em resposta ao tratamento com 11-cetotestosterona	46
V. Discussão	49
1. Efeitos do tratamento com 11-cetotestosterona no índice gonadossomático e na proporção de testículo na gónada da dourada	50
2. Genes diferencialmente expressos em resposta ao tratamento com 11-cetotestosterona na gónada da dourada	51
3. Efeito do tratamento com 11-cetotestosterona na expressão dos receptores de androgénios e estrogénios	53
VI. Conclusão	56
VII. Referências bibliográficas	59
Anexo I – Soluções e meios	73
Anexo II – Preparação de placas e células competentes	76

Lista de abreviaturas

11 β OH	11 β -hidroxilase
11 β HSD	11 β -hidroxiesteróide desidrogenase
11KT	11-cetotestosterona
AF	região activa de transactivação
ANOVA	análise de variância
AR	receptor de androgénios
ARES	elementos responsivos aos androgénios
cDNA	DNA complementar
CPG	eixo cérebro-pituitária-gónada
cpm	cintilações por minuto
DBD	domínio de ligação ao DNA
dCTP	desoxicitosina trifosfato
DEPC	dietilpirocarbonato
DHT	dihidrotestosterona
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleótidos trifosfato
dT	desoxitimina
DTT	ditiotreitol
E ₂	estradiol 17- β
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ER	receptor de estrogénios
FSH	hormona folículo-estimulante
GTH	gonadotropina
HAT	histona acetiltransferase
HDAC	actividade de histona deacetilase
HRE	elementos responsivos às hormonas
HSP	proteínas de choque térmico
IGF	factores de crescimento semelhantes a insulina
IGS	índice gonadossomático

IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosideo
Kb	kilobases
LB	meio de crescimento LB
LBD	domínio de ligação ao ligando
LH	hormona luteinizante
MMLV-RT	transcriptase reversa do vírus Moloney da leucemia murina
mRNA	RNA mensageiro
MOPS	ácido 3[-N-morfolino]propanosulfónico
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
poli(A) ⁺	cauda de poliadeninas do mRNA
RIA	radioimunoensaio
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
RNA _t	RNA total
rRNA	RNA ribossomal
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SDS	dodecil sulfato de sódio
SSC	tampão salino de citrato de sódio
T	testosterona
TAE	tampão TAE
UV	ultravioleta
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactosidase

Lista de figuras

Figura II.1. Representação esquemática de algumas vias de esteroidogénese gonadal em peixes.

Figura II.2. Esquema da regulação da função testicular.

Figura II.3. Representação esquemática dos domínios estruturais e funcionais de um receptor de esteróides.

Figura II.4. Mecanismo de acção das hormonas esteróides.

Figura II.5. Modelo proposto por Segawa e colaboradores para a rede transcripcional do AR.

Figura III.1. Marcadores de peso molecular.

Figura III.2. Mapa do vector pGEM-T Easy.

Figura III.3. Resumo esquemático da técnica de hibridação substractiva.

Figura III.4. Marcador de peso molecular RNA Ladder 0.24-9.5 Kb.

Figura III.5. Montagem utilizada para transferência de RNA do gel para a membrana de nitrocelulose.

Figura IV.1. Variação dos níveis plasmáticos de 11KT e E₂ determinados por RIA em resposta ao tratamento com 10 mg 11KT/kg peso corporal.

Figura IV.2. Variação do índice gonadosomático em resposta ao tratamento com 10 mg 11KT/kg peso corporal.

Figura IV.3. Proporção relativa de tecido testicular nas gónadas de dourada determinada por análise macroscópica, em resposta ao tratamento com 10 mg 11KT / kg peso corporal.

Figura IV.4. Resultado da electroforese do banco de cDNA obtido por hibridação substractiva.

Figura IV.5. Plasmídeos isolados do banco de cDNA obtido pela técnica de hibridação substractiva.

Figura IV.6. Efeito do tratamento com 11KT na expressão dos genes da proteína ribossomal S27a, da quinona reductase e da catepsina analisado por Northern blot.

Figura IV.7. RT-PCR mostrando a expressão do AR, ER α , ER β 1 e ER β 2 nas gónadas de dourada após 2 semanas de tratamento com 11KT (10 mg/kg peso corporal).

Figura IV.8. Expressão dos diferentes receptores nas gónadas de dourada em resposta ao tratamento com 10 mg 11KT/kg peso corporal durante 2 semanas.

Figura IV.9. Expressão dos diferentes receptores em função da proporção de testículo na gónada da dourada.

Lista de tabelas

Tabela II.1. Genes diferencialmente expressos em resposta aos androgénios em tecidos de diferentes espécies identificados através de técnicas de hibridação subtrativa e microarrays.

Tabela III.1. Ratios cDNA:vector usados nas diferentes ligações.

Tabela III.2. Características dos *primers* específicos para o receptor de androgénios, receptores de estrogénios e 18S, usados nas reacções de PCR: sequência, tamanho do fragmento amplificado e ciclo de PCR.

Tabela IV.1. Genes diferencialmente expressos na gónada da dourada em resposta ao tratamento com 11KT isolados por hibridação subtrativa.

I. INTRODUÇÃO GERAL E OBJECTIVOS

Na maioria dos vertebrados, como os mamíferos e as aves, o sexo é determinado pelos cromossomas; noutras espécies, como os peixes e os répteis, o sexo não é determinado aquando da formação do zigoto, sendo a diferenciação sexual influenciada pelo meio ambiente (Crews, 1994). Assim, o desenvolvimento sexual nos peixes é muito mais plástico que nos mamíferos (Shapiro, 1992). Esta plasticidade no desenvolvimento da gónada dos peixes, que contrasta com os padrões mais estáveis encontrados nos vertebrados superiores, tem levantado inúmeras questões acerca do seu significado adaptativo (Chevassus, 1998; Conover, 1984; Shapiro, 1992; Warner, 1988) e da regulação genética e fisiológica envolvida nesse processo (Baroiller *et al.*, 1999).

Os peixes teleósteos exibem grande diversidade de determinação sexual, diferenciação e desenvolvimento, que têm sido investigados sob o ponto de vista sócio-ecológico, ambiental, fisiológico ou molecular. A diferenciação das gónadas é o processo mais facilmente reconhecido como o ponto de partida para a diferenciação sexual. O desenvolvimento sexual da gónada engloba dois importantes processos: 1) gonadogénese, definido como a formação de elementos estruturais e de suporte da gónada, e 2) gametogénese, isto é, a formação dos gametas (Lee *et al.*, 2001).

Yamamoto, em 1969, foi um dos primeiros investigadores a sugerir que os esteróides e seus metabolitos participariam na cascata de diferenciação sexual dos peixes teleósteos (Rowell *et al.*, 2002).

Os peixes, embora não em exclusivo, pois efeitos de esteróides exógenos e xenobióticos têm também sido descritos em mamíferos, são particularmente sensíveis à acção de esteróides exógenos. Ao longo dos anos tem sido demonstrado que a administração de androgénios induz a masculinização das gónadas (Condeça & Canário, 1999; Piferrer *et al.*, 1993; Rinchard *et al.*, 1999; Yamamoto, 1969), o que demonstra o envolvimento destes esteróides no desenvolvimento do testículo. De facto, estudos de estimulação com androgénios em peixes têm indicado, entre outros efeitos, que estes estimulam a espermatogénese (Amer *et al.*, 2001; Cavaco *et al.*, 1998; Cavaco *et al.*, 1999; Nader *et al.*, 1999).

Está assim perfeitamente estabelecido que os esteróides sexuais desempenham um papel fundamental na diferenciação sexual, maturação sexual e no comportamento dos vertebrados, incluindo os peixes. No entanto, se do ponto de vista fisiológico estes processos estão relativamente bem documentados, poucos estudos têm visado estudar as alterações genéticas verificadas em resposta ao tratamento com androgénios (Condeça & Canario, 1999). Em consequência, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos na acção dos androgénios na gónada.

Os androgénios actuam através da ligação a receptores proteicos específicos (receptor de androgénios, AR) que actuam como factores de transcrição induzindo ou reprimindo a expressão de outros genes. Embora o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, nomeadamente as técnicas de hibridação substractiva, “differential display” e “microarrays” tenha aumentado o conhecimento neste domínio, a rede molecular envolvida na acção de resposta aos androgénios está longe de ser completamente conhecida.

Deste modo, torna-se particularmente interessante e actual identificar quais os genes envolvidos na resposta aos androgénios. Esta abordagem irá contribuir para um melhor conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na acção dos androgénios quer na diferenciação da gónada quer, eventualmente, noutros processos fisiológicos.

Assim, os objectivos gerais desta tese são:

1. Identificar genes diferencialmente expressos em resposta aos androgénios na gónada da dourada, *Sparus auratus*, por hibridação substractiva.
2. Estudar a expressão do receptor de androgénios e dos receptores de estrogénios na gónada da dourada em resposta ao tratamento com 11-cetotestosterona (11KT).

II. ANDROGÉNIOS, ESTROGÉNIOS E SEUS RECEPTORES

1. Androgénios: locais de síntese, locais de acção e função biológica

Nos mamíferos, os três esteróides de maior importância na função reprodutora masculina são a testosterona (T), a dihidrotestosterona (DHT) e o estradiol (E_2). De um ponto de vista quantitativo, o androgénio mais importante é a T; mais de 95 % é secretada pela células de Leydig (Braunstein, 2001), sendo os restantes 5 % produzidos pelas glândulas adrenais (Porterfield, 2001). A DHT e o E_2 não só são secretados pelos testículos, mas também são produzidos por conversão, em tecidos periféricos, de precursores de androgénios e estrogénios, produzidos nos testículos e nas glândulas adrenais (Braunstein, 2001). A T pode assim ser metabolizada pela enzima 5α -reductase, que a converte em DHT, ou pela aromatase, que a converte em E_2 . Ao contrário da T, a DHT não pode ser aromatizada a estrogénios (Porterfield, 2001).

Nos peixes teleósteos, os androgénios incluem a T, a 11β -hidroxitestosterona (11β OHT) e a 11KT (Kime, 1987). A 11KT é biossintetizada nos testículos a partir da T por acção de duas enzimas, a 11β -hidroxilase (11β OH) e a 11β -hidroxiesteróide desidrogenase (11β HSD) (Jian *et al.*, 1996; Kusakabe *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2000; figura II.1), e parece ser o androgénio mais importante neste grupo de vertebrados (Borg, 1994).

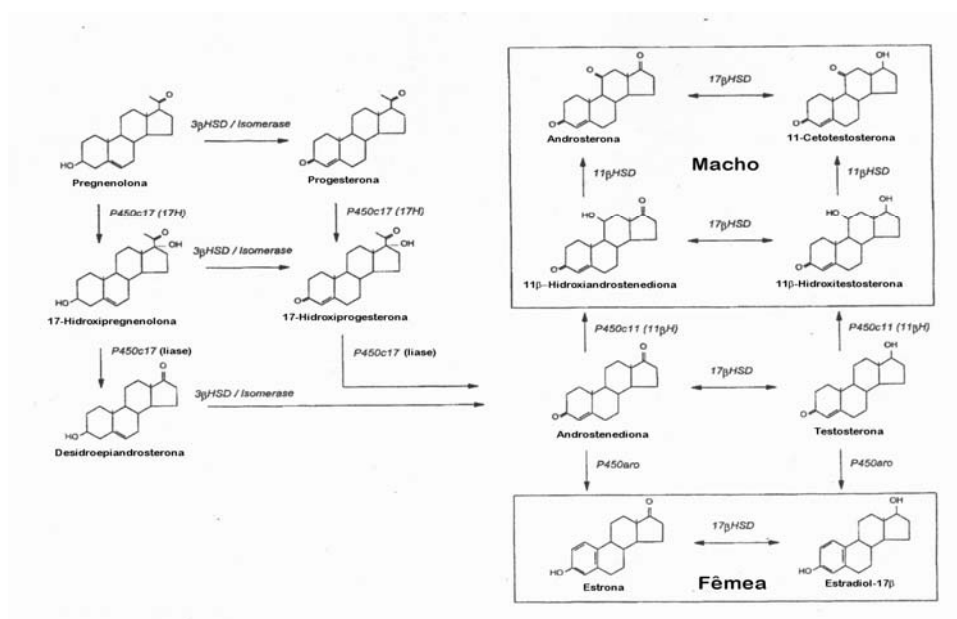


Figura II.1. Representação esquemática de algumas vias de esteroidogênese gonadal em peixes, mostrando a produção de 11KT a partir da T. Adaptado de Baroiller *et al.*, 1999.

Os androgénios produzem uma grande variedade de efeitos biológicos que vão além da função reprodutiva, influenciando a sobrevivência de certas populações de neurónios durante o desenvolvimento (Lieberman *et al.*, 2001); foi também demonstrado terem um efeito protector no sistema vascular arterial (Hanke *et al.*, 2001). A T e a DHT, os dois principais androgénios fisiológicos nos mamíferos, desempenham um papel essencial na diferenciação, desenvolvimento e manutenção do sistema reprodutor masculino (Jänne *et al.*, 1993); são também responsáveis pela maturação deste sistema, que ocorre durante a puberdade, associada ao desenvolvimento da competência funcional do eixo cérebro-pituitária-gónada (CPG), o sistema endócrino responsável pelo controlo do ciclo reprodutivo dos vertebrados. O cérebro, depois de integrar a informação proveniente de estímulos externos ou internos, comunica com a pituitária, influenciando a síntese e/ou libertação de gonadotropinas (GTHs). As GTHs, hormona luteinizante (LH) e hormona foliculo-estimulante (FSH), por sua vez, participam na regulação das duas principais actividades dos testículos: produção de hormonas e de espermatozóides. Os androgénios, produzidos nos testículos,

exercem um mecanismo de “feedback” positivo ou negativo ao nível do cérebro, da pituitária e dos próprios testículos (Porterfield, 2001; figura II.2).

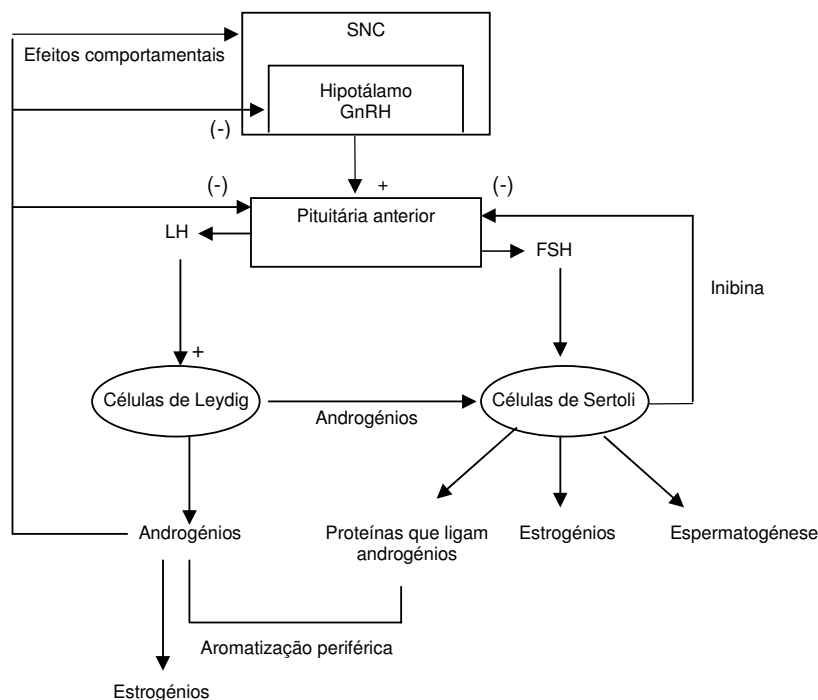


Figura II.2. Esquema da regulação da função testicular. A hormona libertadora da gonadotropina (GnRH) estimula a secreção de LH e FSH pela pituitária anterior. Estas hormonas actuam sobre as células de Leydig e as células de Sertoli para estimular a produção de outras hormonas, proteínas que ligam androgénios e esperma. Os androgénios testiculares e a inibina podem controlar a produção de LH e FSH. SNC, sistema nervoso central. Adaptado de Porterfield, S. (2001).

Os androgénios identificados em peixes, produzidos pelas gónadas e pelo tecido inter-renal, podem também iniciar e/ou acelerar a maturação do eixo CPG, dando início à puberdade (Amer *et al.*, 2001; Cavaco, 1998), sendo também responsáveis pelo comportamento sexual masculino e pelas características sexuais secundárias (Kime, 1987). O papel dos androgénios na diferenciação e desenvolvimento dos testículos tem vindo a ser demonstrado por estudos de estimulação em que a masculinização das gónadas é induzida pelo tratamento hormonal (Condeça & Canario, 1999; Piferrer *et al.*, 1993; Rinchard *et al.*, 1999; Yamamoto, 1969).

A 11KT tem sido identificada como o androgénio circulante mais potente, mais activo (Borg, 1994; Cavaco *et al.*, 2001; Fostier *et al.*, 1983) e mais abundante (Miura *et al.*, 1991), desempenhando um papel importante na maturação sexual, no desenvolvimento de caracteres sexuais secundários e no comportamento reprodutivo (Alam *et al.*, 2005). Vários estudos demonstraram que a 11KT tem um papel crucial na estimulação da espermatogénese no peixe-gato africano (*Clarias gariepinus*; Cavaco *et al.*, 2001), na enguia japonesa (*Anguilla japonica*; Miura *et al.*, 1991) e no salmão-real (*Hucho perryi*; Amer *et al.*, 2001). A 11KT pode induzir e manter o processo completo da espermatogénese *in vitro*, sendo a sua acção mediada pelas células de Sertoli (Miura *et al.*, 1991). Os diferentes estágios da espermatogénese estão correlacionados com os níveis séricos de androgénios (Amer *et al.*, 2001). Em numerosas espécies de peixes teleósteos, os níveis de androgénios são altos durante as fases finais da espermatogénese mas diminuem drasticamente após o início da espermiacção (Amiri *et al.*, 1996; Fostier *et al.*, 1983; Mayer *et al.*, 1992; Ueda *et al.*, 1983). Os elevados níveis de 11KT sugerem uma relação directa entre esteróides e produção de esperma (Amer *et al.*, 2001; Kusakabe *et al.*, 2002).

Estudos efectuados demonstraram que a proliferação celular que ocorre durante a espermatogénese leva a um aumento do índice gonadossomático (IGS), definido como o quociente entre o peso da gónada e o peso corporal, na dourada, como consequência de um aumento do tamanho da gónada (Chaves-Pozo *et al.*, 2004). Nos peixes, o IGS atinge o máximo logo após o início da meiose, diminuindo durante a espermiogénese; esta diminuição é devida à eliminação do citoplasma dos espermatídios pelas células de Sertoli (Billard, 1992).

Os níveis plasmáticos de 11KT estão associados à função testicular do pargo (*Acanthopagrus schlegeli*; Chang *et al.*, 1995 a,b) e desempenham um papel importante na inversão sexual, natural e controlada, de diversas espécies de teleósteos (Cardwell & Liley, 1991; Kroon & Liley, 2000). Também em espécies protogínicas se verificou um aumento do nível de 11KT durante a mudança de sexo (Cardwell & Liley, 1991; Nakamura *et al.*, 1989).

Alguns estudos foram feitos de modo a investigar as potencialidades esteroidogénicas das gónadas durante o processo de diferenciação. Na tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), estudos demonstraram que a actividade da aromatase era específica dos ovários pouco tempo depois da diferenciação, enquanto que a actividade da 11 β OH e da 11 β HSD era específica dos testículos (Baroiller, 1988; Baroiller *et al.*, 1998), tendo sido observado o mesmo padrão durante a diferenciação da gónada na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*; Baroiller *et al.*, 1999). Isto sugere um papel importante do E₂ e da 11KT, respectivamente, na diferenciação dos ovários e testículos.

Devido à natureza não aromatizável da 11KT não se atribuía qualquer efeito aos androgénios no desenvolvimento sexual feminino (Alam *et al.*, 2005). No entanto, androgénios e AR têm sido identificados em tecidos do sistema reprodutor feminino (D'Cotta *et al.*, 2001; Staub & De Beer, 1997), podendo desempenhar um papel relevante na função ovárica (Alam *et al.*, 2005; Braun & Thomas, 2003). Estudos recentes sugerem que teleósteos fêmeas apresentam níveis plasmáticos de 11KT significativos que aumentam nas fases finais da oogénese (Alam *et al.*, 2005).

2. Estrogénios: locais de síntese, locais de acção e função biológica

Nos vertebrados, o ovário maduro sintetiza e secreta activamente vários tipos de hormonas, principalmente estrogénios (Goldfien, 2001). Em teleósteos machos, os estrogénios podem ser produzidos pelos testículos ou por aromatização local dos androgénios (Sharpe, 1998).

Os estrogénios incluem o E₂ e a estrona; estas hormonas são responsáveis pelas características sexuais secundárias nos mamíferos (Kime, 1987), sendo o E₂ o mais potente e o mais abundante estrogénio ovárico (Porterfield, 2001). Estas hormonas desempenham também um papel importante no metabolismo ósseo, mantendo a estrutura do osso e prevenindo o aparecimento da osteoporose (Chrisitiansen, 1990; Lichtman, 1996; Lufkin *et al.*, 1992; Turner *et al.*, 1994). Possuem ainda efeitos metabólicos que antagonizam a acção da

insulina nos tecidos periféricos, diminuindo a tolerância à glicose. Para além disso, os estrogénios diminuem os valores séricos de colesterol e aumentam os níveis de lipoproteínas de alta densidade (colesterol HDL; Lichtman, 1996; Nabulsi *et al.*, 1993; Porterfield, 2001; Rosano *et al.*, 1996), que conferem protecção cardiovascular. Ao nível do sistema nervoso central, os estrogénios estão envolvidos nos mecanismos de “feedback” que controlam a função reprodutora, (Clark & Markaverich, 1988; Shupnik, 1996), a diferenciação sexual do cérebro e a vitelogénese em vertebrados fêmeas não mamíferos (Kime, 1987).

Embora os estrogénios sejam considerados hormonas femininas com numerosos tecidos-alvo no sistema reprodutivo feminino, dados recentes sugerem que estes possam também ter um papel importante na regulação da função das gónadas masculinas. Estudos com ratos em que o gene do receptor de estrogénios (ER) foi silenciado demonstraram que é necessário um ER funcional para garantir uma espermatogénese e, conseqüentemente, uma fertilidade normais (Eddy *et al.*, 1996). A administração de E₂ em ratos induz a espermatogénese normal e completa, sugerindo que os estrogénios são hormonas masculinas indispensáveis (Ebling *et al.*, 2000). Nos vertebrados machos, os níveis de E₂ são muito baixos ou mesmo indetectáveis; o valor mais elevado é observado durante a mitose, indicando o envolvimento dos estrogénios na espermatogénese e função testicular. No entanto, a variabilidade dos níveis de E₂ durante a espermatogénese torna difícil estabelecer o papel dos estrogénios neste processo (Amer *et al.*, 2001).

Nos peixes, o E₂ desempenha funções no sistema reprodutor, nomeadamente no controlo da vitelogénese e diferenciação sexual, existindo estudos que relacionam estrogénios com o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários (Kishida *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2000; Rothbard *et al.*, 1996) e com a feminização das gónadas (Condeça & Canario, 1999; Saidapur *et al.*, 2001; Socorro, 2000; Yamamoto, 1969). No entanto há efeitos controversos no que diz respeito à espermatogénese. A exposição do robalo (*Dicentrarchus labrax*), uma espécie hermafrodita protogínica, ao E₂ durante a fase final da ontogénese pode induzir efeitos negativos, a longo prazo, no testículo, directa ou indirectamente, resultando numa diminuição da capacidade reprodutora dos

machos aquando da fase de maturação sexual (Blázquez *et al.*, 1998). Na dourada, o E₂ despoleta a inversão sexual (Condeça & Canario, 1995; Condeça & Canario, 1999; Happe & Zohar, 1988).

O E₂ é assim considerado uma hormona masculina indispensável que desempenha um papel fisiológico importante em alguns aspectos da função testicular, especialmente na mitose (Amer *et al.*, 2001; Miura *et al.*, 1999).

3. Receptores de androgénios e receptores de estrogénios

3.1 A superfamília dos receptores nucleares

A actuação das hormonas esteróides nas células-alvo é mediada por receptores específicos, que pertencem à família dos receptores nucleares (Robinson-Rechavi *et al.*, 2003).

Os receptores nucleares formam uma superfamília de proteínas filogeneticamente relacionadas (Evans, 1998), incluindo receptores para moléculas hidrofóbicas como hormonas esteróides (por exemplo, estrogénios, glucocorticóides, progesterona, mineralocorticóides, androgénios, vitamina D), ácidos retinóicos, hormonas da tiróide, ácidos gordos e prostaglandinas (Jänne *et al.*, 1993). As proteínas pertencentes a esta família são dependentes de ligandos e a sua função é modular a expressão de genes de um modo específico em células e tecidos (Gardner, 2001). Constituem assim uma das classes mais abundantes de reguladores da transcrição em eucariotas (Tsay & O'Malley, 1994), actuando como factores de transcrição em animais e regulando diversas funções, tais como homeostasia, reprodução, desenvolvimento e metabolismo (Robinson-Rechavi *et al.*, 2003).

3.2 Estrutura proteica

Os receptores nucleares possuem uma organização estrutural comum. Qualquer proteína pertencente à superfamília dos receptores nucleares tem três regiões funcionais distintas, que são, partindo da região N-terminal (figura II.3): domínio de transactivação, região de ligação ao DNA e domínio de ligação ao ligando (Jänne *et al*, 1993).

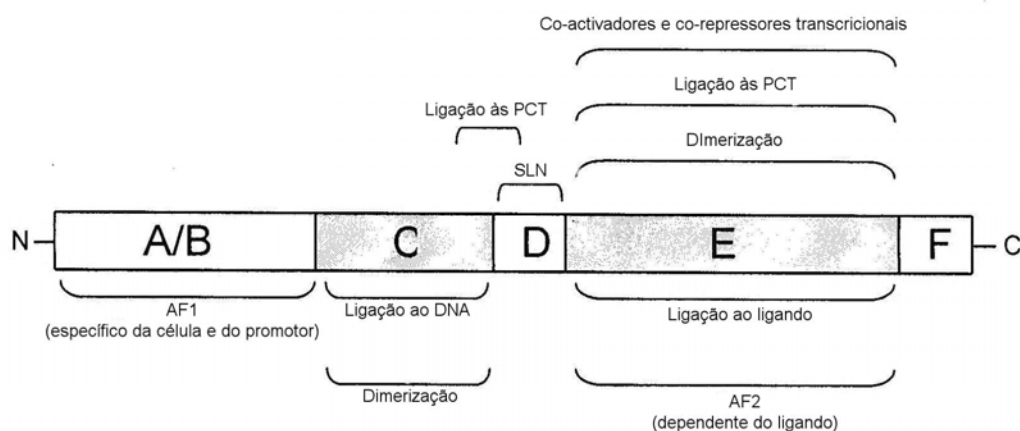


Figura II.3. Representação esquemática dos domínios estruturais e funcionais de um receptor de esteróides. As regiões C e E são regiões altamente conservadas. A região F apenas existe no ER. A função de cada domínio está indicada. SLN, sinal de localização nuclear; AF, função de activação transcricional; PCT, proteínas de choque térmico. Adaptado de Socorro, S. (2001).

O tamanho molecular médio de uma proteína pertencente a esta família depende essencialmente do comprimento do seu domínio de transactivação. O AR é uma das maiores proteínas desta família, fazendo parte da sua sequência 902 a 919 resíduos de aminoácidos (Jänne *et al.*, 1993); já o ER é uma proteína mais pequena, sendo formada por 500-600 resíduos de aminoácidos (Socorro, 2001).

A região N-terminal, também denominada domínio A/B, é altamente variável, contendo uma região activa de transactivação (AF-1) e vários domínios de transactivação autónomos (Robinson-Rechavi *et al.*, 2003). Embora a região N-terminal do receptor seja denominada de transactivadora, a sua função ainda não foi delineada com grande detalhe para nenhum dos receptores nucleares. No entanto, actualmente sabe-se que esta região contém informação para, pelo

menos, dois aspectos-chave: i) otimizar a capacidade de transactivação do receptor e ii) tornar específico o reconhecimento de genes na regulação transcricional. Os domínios de transactivação dos diferentes membros da superfamília dos receptores nucleares possuem as sequências de aminoácidos menos conservadas, o que, potencialmente, irá permitir a interação de um determinado receptor com outras proteínas celulares, de um modo específico (Jänne *et al.*, 1993).

Os receptores de esteróides reconhecem sequências de DNA específicas através de um domínio funcional que inclui 66-68 aminoácidos. Esta região (DBD – domínio de ligação ao DNA) é rica em cisteínas e dobra-se sobre si mesma, formando duas estruturas “zinc-finger”, com um átomo de zinco coordenado tetraedricamente com quatro cisteínas. A primeira estrutura “zinc-finger” torna específico o reconhecimento do DNA por parte do receptor e a segunda estrutura (C-terminal) é responsável pela dimerização de duas moléculas de receptor, aquando da sua associação ao DNA. A semelhança entre DBD do AR e de outros receptores de hormonas esteróides é maior do que as semelhanças entre as outras zonas funcionais; a homologia deste domínio varia entre os 50 e os 80% entre diferentes membros da família dos receptores nucleares. O DBD interage com elementos *cis* dos genes regulados, conhecidos como elementos responsivos a hormonas (HREs), que são sequências palindrómicas de 15 nucleótidos, localizadas na extremidade 5' do gene (Jänne *et al.*, 1993).

A região C-terminal dos receptores nucleares está envolvida na ligação ao ligando e na interação com proteínas de choque térmico (HSP – “heat shock proteins”; Jänne *et al.*, 1993). O domínio de ligação ao ligando (LBD - “ligand binding domain”) é uma estrutura mais ou menos conservada e é responsável por várias funções induzidas pelo ligando, como a transactivação da AF-2 e a repressão (Robinson-Rechavi *et al.*, 2003). A semelhança entre esta sequência no AR e noutros receptores de esteróides indica que androgénios, progestinas e glucocorticóides podem interagir com mais do que um tipo de receptor (Jänne *et al.*, 1993).

A acção dos estrogénios é mediada por duas formas de ER, conhecidas como α e β , (ER α e ER β), que foram clonadas em humanos e outras espécies.

Desde a clonagem do ER, em 1986 (Green *et al.*, 1986), acreditava-se que existia apenas uma forma do receptor (McInerney *et al.*, 1998), uma vez que as tentativas de clonar outras, baseadas na homologia de sequências falharam. Mais recentemente, a procura de novos membros desta superfamília através de uma combinação de reacção em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) usando primers degenerados com a pesquisa de um banco de genes revelou a existência de um outro tipo de ER no rato, designado ER β (Kuiper *et al.*, 1996). A forma clássica de ER passou a ser designada como ER α . Quase simultaneamente com a clonagem do ER β no rato foi isolado o ER β no homem (Mosselman *et al.*, 1996; Ogawa *et al.*, 1998), ao que se seguiu a clonagem desta isoforma em espécies piscícolas (Chang *et al.*, 1999; Socorro, 2001; Tchoudakova *et al.*, 1999; Xia *et al.*, 1999). Adicionalmente nos peixes foi identificada uma nova forma de ER, o ER β 2 (Bardet *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2000). A forma β 2 do ER tem uma estrutura e um padrão de expressão diferente da forma β 1, sendo o ER β 2 predominantemente expresso no cérebro, pituitária e fígado do peixe-dourado (*Carassius auratus*; Ma *et al.*, 2000). Esta segunda forma de ER β foi também identificada em diferentes populações celulares do testículo humano, sendo caracterizada como uma variante do ER que não tem capacidade de se ligar ao E₂ nem de recrutar cofactores através do domínio AF-2 (região de transactivação dependente do ligando), e afectando a capacidade de resposta a estrogénios endógenos ou exógenos nas células onde é expresso (Saunders *et al.*, 2002).

3.3 Modo de actuação

Os esteróides sexuais medeiam as suas acções interagindo com proteínas receptoras intracelulares pertencentes à família dos receptores nucleares (Jänne *et al.*, 1993). Na ausência de ligando, os receptores são transcricionalmente inactivos e encontram-se ligados a HSP. A ligação do ligando ao LBD induz uma alteração conformacional na estrutura do receptor, que se dissocia das HSP e permite a sua interacção com sequências de DNA específicas. Após a ligação ao DNA, o complexo activo hormona-receptor actua como um factor de transcrição,

modulando a síntese de mRNAs e proteínas específicos, que são responsáveis pelo efeito final da hormona (MacKay *et al.*, 1996; McDonnell *et al.*, 1993; Tsay & O'Malley, 1994; figura II.4.).

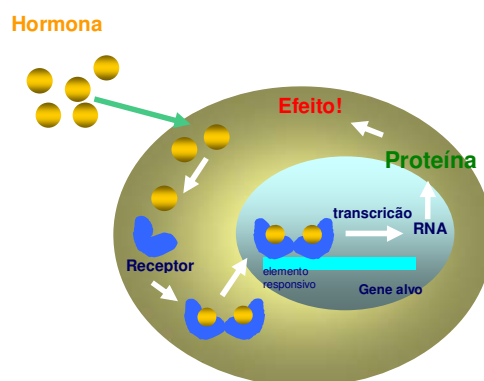


Figura II.4. Mecanismo de acção das hormonas esteróides. Adaptado de Socorro, S. (2001).

Os receptores nucleares actuam em três passos: repressão, desrepressão e activação. A repressão é característica do receptor aponuclear, que recruta um complexo co-repressor com actividade de diacetilação das histonas (HDAC). A desrepressão ocorre após a ligação do ligando; o complexo HDAC dissocia-se e é recrutado um primeiro complexo co-activador com actividade histona acetiltransferase (HAT), resultando na descondensação da cromatina, processo necessário mas não suficiente para a activação do gene-alvo. Durante a activação o complexo co-activador HAT dissocia-se e um segundo complexo co-activador é recrutado, permitindo estabelecer contacto com a maquinaria transcrricional e resultando na activação do gene-alvo. É de notar que este mecanismo de funcionamento não é geral pois há receptores nucleares que actuam como activadores sem ligando, enquanto que outros são incapazes de interagir com o promotor do gene-alvo na ausência do ligando (Robinson-Rechavi *et al.*, 2003); um receptor dependente de ligando que não esteja ligado a uma molécula de esteróide, em condições fisiológicas, é incapaz de influenciar a expressão de genes (Jänne *et al.*, 1993). Os efeitos biológicos das hormonas androgénicas são assim exercidos através da regulação da expressão de proteínas efectoras específicas e da iniciação de cascatas de sinalização. Um dos mecanismos de expressão de genes mediados por androgénios envolve a interacção directa entre

a hormona e o AR, resultando na translocação nuclear do complexo hormona-receptor (Nelson *et al.*, 2002).

O AR pode comunicar com a maquinaria de transcrição através do promotor de modo a exercer a sua função como modulador transcricional (Lee & Chang, 2002). No núcleo, o complexo androgénio-receptor liga-se ao DNA através do DBD, reconhecendo regiões reguladoras próximas de genes específicos, o que vai permitir que a porção transactivadora terminal do receptor inicie a actividade transcricional e module a expressão desses genes. (Braustein, 2001; Jänne *et al.*, 1993). A ligação a estes promotores e a sequências activadoras, conhecidas como elementos de resposta a androgénios (AREs) e regiões reguladoras de androgénios, respectivamente, facilita as interacções com a maquinaria transcricional, levando à transcrição de genes (Nelson *et al.*, 2002). Este processo resulta na produção de mRNA que é eventualmente transportado para o citoplasma, onde dirige a síntese de novas proteínas e outras alterações que, em conjunto, constituem a acção dos androgénios (Braustein, 2001).

As hormonas podem regular a expressão de genes regulando a iniciação da transcrição. No entanto, a regulação também pode ser exercida na terminação da transcrição, no processamento do pré-mRNA, na degradação do mRNA e na tradução (Porterfield, 2001). Alternativamente, os genes-alvo de androgénios podem ser regulados indirectamente, actuando como um passo secundário através da regulação directa ou libertação de um factor de transcrição, que por sua vez regula a expressão de outros genes-alvo. Um mecanismo como este permite que existam vários níveis de controlo de regulação, o que pode ser vantajoso para o direccionamento da síntese proteica, para a amplificação da sinalização dos androgénios e para a expressão coordenada dos genes envolvidos nos processos metabólicos mais comuns (Nelson *et al.*, 2002).

Os androgénios podem também afectar a expressão de genes através de mecanismos independentes do genoma e mecanismos pós-transcricionais (Nelson *et al.*, 2002).

A expressão do AR parece ser regulada e mantida pelos próprios androgénios (Blanchere *et al.*, 1998; Burnstein *et al.*, 1995), que elevam os níveis de expressão do AR em células de Leydig imaturas (Shan *et al.*, 1997), na

próstata ventral (Suzuki *et al.*, 1997) e tracto genital de rato (Bentvelsen *et al.*, 1995), assim como nos neurónios motores (Drengler *et al.*, 1997).

4. Genes diferencialmente expressos em resposta aos androgénios na gónada da dourada

Embora seja evidente o papel dos androgénios na masculinização das gónadas (Alam *et al.*, 2005; Cavaco *et al.*, 1998; Cardwell & Liley, 1991; Jänne *et al.*, 1993; Kroon & Liley, 2000; Porterfield, 2001) e na espermatogénese (Amer *et al.*, 2001; Cavaco *et al.*, 2001; Kusakabe *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 1991; Schulz *et al.*, 2000;) nos vertebrados em geral, os estudos de genes diferencialmente expressos no testículo em resposta aos androgénios são escassos.

Os estudos existentes sobre genes diferencialmente expressos em resposta aos androgénios restringem-se ao fígado do achigã (Blum *et al.*, 2004), gónada de tilapia (D'Cotta *et al.*, 2001), próstata de rato (Jiang & Wang, 2003) e homem (Nelson *et al.*, 2002), linhas celulares tumorais da próstata (Segawa *et al.*, 2002), testículo e epidídimo de rato (Lindsey & Wilkinson, 1996), testículo de ratinho (Zhou *et al.*, 2005) e linhas celulares neuronais (Lieberman *et al.*, 2001); estes genes estão resumidos na tabela II.1.

Estudos efectuados na próstata mostraram que a maior categoria de genes activados pelos androgénios é a dos genes envolvidos no metabolismo. Foi demonstrado que, em células do epitélio de próstata humana, os genes cuja expressão foi, de algum modo, alterada em resposta aos androgénios, se dividem em 3 grupos (Nelson *et al.*, 2002): genes envolvidos na síntese de ácidos gordos e lípidos (como por exemplo, acetil-CoA-carboxilase), genes envolvidos no transporte de biomoléculas (como por exemplo, FKBP5, um membro da família das imunofilinas, que está envolvido na determinação da conformação e transporte de proteínas) e genes envolvidos na proliferação celular ou diferenciação (como a cinase 8 dependente de ciclina (CDK8) que, juntamente com a sua subunidade C, são os componentes do complexo holoenzimático da

RNA polimerase II, que fosforila a subunidade maior da RNA polimerase II). Genes envolvidos na progressão do ciclo celular e apoptose são também activados pelos androgénios na próstata (Jiang & Wang, 2003).

Em células cancerosas da próstata os androgénios induzem a expressão de genes de resposta ao stress no retículo endoplasmático. Com este estudo Segawa e colaboradores (2002) propuseram um modelo de acção dos androgénios via AR: após ligação do androgénio ao receptor, a primeira resposta transcricional seria a produção de factores de transcrição, que por sua vez iriam activar a maquinaria de transcrição de genes envolvidos na biossíntese de ácidos gordos, na biossíntese de poliaminas e na resposta ao stress oxidativo. Todos estes processos culminariam na diferenciação e proliferação celular e na carcinogénese (figura II.5; Segawa *et al.*, 2002).

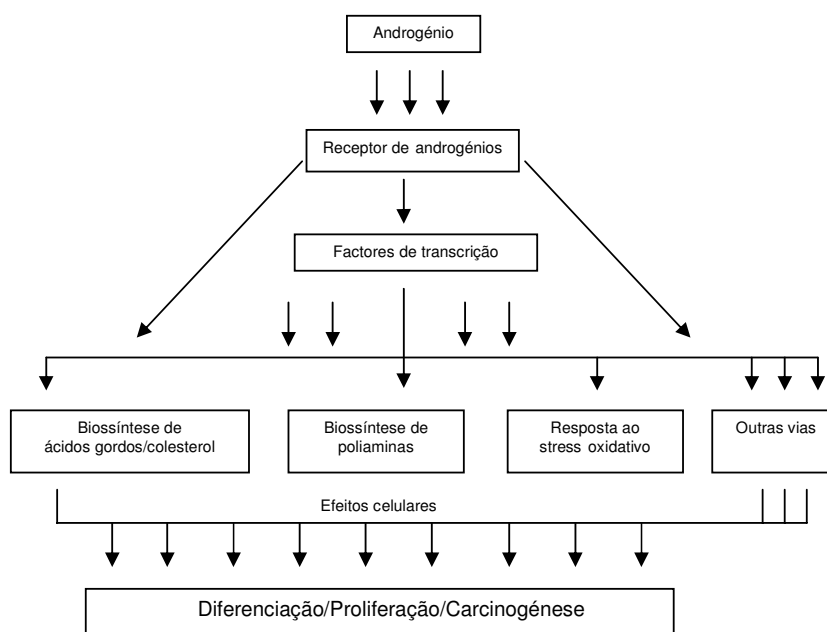


Figura II.5. Modelo proposto por Segawa e colaboradores para a rede transcricional do AR. Adaptado de Segawa *et al.* (2002).

Os androgénios também demonstraram aumentar a expressão de genes envolvidos no processamento do RNA (Lieberman *et al.*, 2001).

Um outro estudo, efectuado em ratos, avaliou a existência de genes diferencialmente expressos no testículo e epidídimo; este estudo revelou que o

gene Pem, que codifica para uma proteína que se liga ao DNA e que regula a expressão de outros genes localizados a jusante, é regulado pela T, facto apoiado pelo aumento drástico dos níveis de expressão do mRNA desse gene, coincidente com a indução de genes responsivos à T. Pem foi o primeiro factor de transcrição para o qual se demonstrou que a sua expressão é regulada pelos androgénios (Lindsey & Wilkinson, 1996).

Em peixes, existe um estudo de genes diferencialmente expressos no fígado do achigã (*Micropterus salmoides*) em resposta aos androgénios; esse estudo revelou que os genes que respondem ao tratamento com androgénios estão envolvidos em diversos processos como metabolismo dos lípidos ou interacção de proteínas (Blum *et al.*, 2004); alguns desses genes são comuns aos identificados noutros tecidos de mamíferos (ver tabela II.1).

Tabela II.1. Genes diferencialmente expressos em resposta aos androgénios em tecidos de diferentes espécies identificados através de técnicas de hibridação subtractiva e microarrays.

Função	Gene	Tecido	Referência
Metabolismo	Uridina difosfoglucoose desidrogenase	➤ Mama (canceroso)	➤ Lapointe & Labrie, 1999
	Farnesil difosfato sintetase	➤ Próstata rato ➤ Epitélio próstata	➤ Jiang & Wang, 2003 ➤ Nelson <i>et al.</i> , 2002
	3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintetase citosólica	➤ Próstata rato	➤ Jiang & Wang, 2003
	Espermidina sintetase	➤ Próstata rato ➤ Epitélio próstata	➤ Jiang & Wang, 2003 ➤ Nelson <i>et al.</i> , 2002
	Espermina/espermidina N1-acetiltransferase (SSAT)	➤ Próstata (canceroso) ➤ Fígado de achigã	➤ Segawa <i>et al.</i> , 2002 ➤ Blum <i>et al.</i> , 2004
	NAD + - isocitrato desidrogenase subunidade γ	➤ Próstata rato	➤ Jiang & Wang, 2003
	Mio-inositol 1- fosfato sintetase	"	"
	Esqualeno epoxidase	"	"
	Tioredoxina	"	"
	S-adenosilmetionina sintetase (tipo não hepático)	"	"
	Nucleosido difosfato cinase (isoforma β)	"	"
	Lanosterol 14-α-desmetilase	"	"
	UDP galactose transporter related isozima 1	"	"
	Receptor LDL	➤ Próstata rato ➤ Próstata(canceroso) ➤ Fígado de achigã	➤ Jiang & Wang, 2003 ➤ Segawa <i>et al.</i> , 2002 ➤ Blum <i>et al.</i> , 2004
	Aspartato aminotransferase mitocondrial	➤ Próstata rato	➤ Jiang & Wang, 2003
	Fosfoglicerato cinase ligada ao cromossoma X	"	"
	pl esterase	"	"
	Translocador mitocondrial da adenina	"	"

Metabolismo	Aldeído desidrogenase	"	"
	Nucleosido difosfato cinase (isoforma α)	➤ Próstata rato	➤ Jiang & Wang, 2003
	Acil-CoA sintetase	"	"
	Carboxilesterase hepática	"	"
	2,3-Oxidosqualeno:lanosterol ciclase	"	"
	Pirrolina-5-carboxilato sintetase (isoforma longa)	"	"
	AdoMetDC	"	"
	Receptor de vitelogenina	➤ Fígado achigã	➤ Blum <i>et al.</i> , 2004
	ATPase 6	➤ Fígado achigã	➤ Blum <i>et al.</i> , 2004
	Acil-CoA carboxilase	➤ Próstata	➤ Nelson <i>et al.</i> , 2002
Proteínas "chaperoning and trafficking"	Calreticulina	➤ Próstata rato	➤ Jiang & Wang, 2003
	Proteína de ligação à cadeia pesada da Ig	"	"
	Disulfide isomerase	"	➤ Jiang & Wang, 2003 ➤ Segawa <i>et al.</i> , 2002
	Imunofilina FKBP51	➤ Próstata rato ➤ Próstata	➤ Jiang & Wang, 2003 ➤ Nelson <i>et al.</i> , 2002
	CaBP1	➤ Próstata rato	➤ Jiang & Wang, 2003
	Endoplasmína	"	"
	Homóloga sec61	"	"
	SDF2L1	"	"
	ERj3	"	"
	SEC23B	"	"
	Ciclofilina B	"	"
	ORP150	"	"
	Percursor da proteína de ligação FK506	"	"
	Ciclofilina	"	"
	Factor 4 de ribosilação do ADP	"	"
	Proteína do retículo endoplasmático	"	"
	Percursor da ERp29	"	"
	Calumenina	"	"
	Factor de transporte vesicular p115	"	"
	Fkbp13	"	"
Síntese proteica	Proteína de membrana associada ao ribossoma RAMP4	"	"
	Proteína ribossomal S27a	➤ Próstata rato ➤ Fígado de achigã	➤ Jiang & Wang, 2003 ➤ Blum <i>et al.</i> , 2004
	Proteína de ancoragem	➤ Próstata rato	➤ Jiang & Wang, 2003
	Receptor do ribossoma	"	"
	Factor de iniciação eucariótico 4A	"	"
	Factor iniciação da tradução (eIF-2), subunidade α	"	"

Processamento RNA	tra-2 α	➤ Linha celular neuronal	➤ Lierberman et al., 2001
	fox-1	"	"
Proteínas secretadas	Caliceína glandular	➤ Próstata rato	➤ Jiang & Wang, 2003
	IGF-1	➤ Próstata rato ➤ Fígado de achigã	➤ Jiang & Wang, 2003 ➤ Blum et al., 2004
	Endopeptidase neutra	➤ Próstata rato	➤ Jiang & Wang, 2003
	Fosfatase alcalina	"	"
	BMP-6	"	"
Proliferação celular diferenciação	cdc14B	➤ Próstata	➤ Nelson et al., 2002
	Cinase dependente de ciclina 8 (CDK8)	"	"
	Oncoproteína Maf	"	"
	Inibidor de proliferação 2 (ID2)	"	"
Ciclo celular e apoptose	cdc2	➤ Próstata rato	➤ Jiang & Wang, 2003
	Geminina	"	"
	GADD45 γ	"	"
	Proteína do centrômero	"	"
	Factor nuclear K α	➤ Próstata (canceroso)	➤ Segawa et al., 2002
Proteínas estruturais e da matriz extracelular	β -tubulina	➤ Próstata rato	➤ Jiang & Wang, 2003
	Proteína da mielina e do linfócito	"	"
	Colagénio α 1 tipo 1	"	"
	α -tubulina	➤ Próstata rato ➤ Fígado de achigã	➤ Jiang & Wang, 2003 ➤ Blum et al., 2004
	Colagénio tipo VI	➤ Próstata rato	➤ Jiang & Wang, 2003
	Haptoglobina	➤ Fígado achigã	➤ Blum et al., 2004
Outras funções	Proteína rica em arginina	➤ Próstata rato	➤ Jiang & Wang, 2003
	DNA topoisomerase II	"	"
	Fosfoproteína citosólica	"	"
	Proteína sensível aos esteróides	"	"
	Proteína HT	"	"
	Inibidor de ligação ao diazepam	"	"
	UCP2	"	"
	Proteína induzida pela progesterona	"	"
	Timidina cinase	"	"
	Arrestina-E	"	"
	Proteína de ligação às lipoproteínas	"	"
	p24B	"	"
	Elemento α VL30	"	"
	UCP3	"	"

Outras funções	Hidrolase C-terminal da ubiquitina	➤ Próstata rato	➤ Jiang & Wang, 2003
	Mpv17	➤ Testículo rato	➤ Zhou et al., 2005
	H2D1	"	"
	Canal de cálcio	"	"
	Angiotensina	"	"

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Metodologias gerais

Neste capítulo serão descritos os métodos usados rotineiramente na execução desta tese.

1.1. Algumas considerações sobre segurança

Quando se realizam trabalhos na área da biologia molecular é necessário proteger não só o material biológico que constitui o objecto de estudo, mas também quem o manipula.

Em todas as técnicas foram usadas luvas e bata, de modo a proteger as amostras de contaminações e também como protecção do investigador contra produtos químicos, nomeadamente fenol e brometo de etídio. A manipulação destes produtos foi feita, sempre que possível, na hotte.

A clonagem de produtos de reacção em cadeia da polimerase (PCR) foi feita usando estirpes atenuadas de *Escherichia coli*; no entanto, todos os procedimentos que envolveram a utilização destas estirpes de bactérias foram executados em ambiente estéril e com as devidas precauções, de modo a evitar contaminações. Os restos foram descartados depois de autoclavados.

A visualização de géis de agarose foi feita num transiluminador devidamente isolado, de modo a que a luz UV não se projectasse para o exterior.

1.2. Experiência de tratamento com 11-cetotestosterona

1.2.1. Animais

A dourada é uma espécie hermafrodita protândrica, desenvolvendo um testículo no primeiro ano de vida e sofrendo a primeira maturação como macho. Entre o segundo e terceiro anos de vida, o testículo regride, e os animais sofrem uma inversão sexual, passando a desenvolver um ovário activo. Deste modo, é

possível encontrar animais com cerca de um ano apresentando uma gónada mista.

Indivíduos com cerca de um ano de idade foram separados em dois grupos de 8 elementos cada (grupo controlo e grupo tratado) e ficaram a aclimatizar durante 3 dias. Após esse período de tempo, os animais foram pesados e de seguida procedeu-se à experiência de estimulação. Ao grupo tratado foi administrada, por injeção intraperitoneal, 11KT previamente diluída em etanol absoluto (Merck) e misturada com óleo de coco (Sigma), de modo a obter uma dosagem de 10 mg/kg de peso corporal. Ao grupo controlo foi apenas administrada a suspensão de óleo de coco e etanol.

Os animais foram mantidos durante duas semanas em tanques de 500 litros com arejamento, fotoperíodo natural e água à temperatura ambiente, tendo sido alimentados diariamente *ad libitum*.

1.2.2. Amostragem

Após duas semanas de período experimental, os peixes foram anestesiados com 2-fenoxi-etanol (Sigma), pesados e foram recolhidas amostras de sangue por punção da vasculatura caudal usando seringas de 1 ml contendo heparina; o sangue foi guardado em tubos Eppendorf contendo solução anticoagulante e centrifugado a 800xg durante 15 minutos. O plasma foi recolhido e armazenado a -20°C até à determinação dos níveis de esteróide por radioimunoensaio (RIA).

De seguida, os animais foram decapitados e recolheram-se as gónadas. As amostras foram colocadas em tubos Eppendorf, imediatamente congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80 °C até à extracção do RNA total (RNAt). Todos estes procedimentos foram executados usando bata, luvas e material estéril, de modo a evitar a contaminação com ribonucleases (RNases).

1.2.3. Determinação dos níveis plasmáticos de 11-cetotestosterona e de estradiol

Os níveis de esteróides no plasma foram determinados por RIA, utilizando anticorpos monoclonais de acordo com o protocolo descrito por Scott e Canário (1992). Os esteróides livres foram extraídos do plasma com éter dietílico, tendo-se procedido à evaporação em vácuo e posterior ressuspensão em solução tampão; em cada RIA usaram-se 50 µl de amostra. As amostras foram incubadas com hormona marcada fria (antigénio não marcado) e misturadas com anticorpos anti-11KT e anti-E₂. Após a formação de complexos antigénio-anticorpo, foi adicionado carvão activo e as amostras foram centrifugadas. Foi adicionado líquido de cintilação e foram medidas as cintilações por minuto (cpm). A quantificação foi feita recorrendo a uma curva de calibração para RIA, feita com base em soluções-padrão com concentrações conhecidas, e processada em simultâneo com as amostras.

1.2.4. Determinação do índice gonadossomático

O IGS é definido com o quociente entre o peso da gónada e o peso corporal. Para determinar o IGS pesaram-se os peixes antes do sacrifício, e as respectivas gónadas após a recolha dos tecidos. O IGS foi calculado para cada indivíduo isoladamente e foi efectuada a média para cada um dos grupos, isto é, controlo e tratado. De modo a verificar se as médias eram significativamente diferentes efectuou-se uma análise de variância (ANOVA) seguida de um teste de Tukey. Considerou-se significativamente diferente para valores de p menores que 0,05 ($p \leq 0,05$).

1.2.5. Determinação da proporção de testículo na gónada

Por observação macroscópica directa foi determinada a percentagem relativa de testículo presente nas gónadas dos animais em estudo. Os tecidos de cor branca foram identificados como gónada masculina e os tecidos de cor alaranjada foram identificados como gónada feminina.

1.3. Extracção do RNA total

O RNA total das gónadas foi extraído usando o kit RNeasy™ Lipid Tissue (Qiagen Inc.) seguindo as instruções do fabricante e tomando todas as precauções necessárias para evitar contaminações com outro material biológico e com RNases.

O RNA total extraído foi eluído em água tratada com DEPC (Anexo I) e foram lidas as absorvâncias das amostras a 260nm e a 280nm num espectrofotómetro Ultrospec® 3000 (Pharmacia Biotech), de modo a calcular a concentração de RNA ($1\text{Abs}_{260} = 40\mu\text{g RNA/ml}$) e a averiguar a qualidade do RNA extraído pelo ratio entre as absorvâncias a 260 e a 280nm (ratio dever ser maior ou igual a 1,7); as amostras foram também submetidas a electroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, de modo a avaliar a integridade do RNA extraído.

As amostras não usadas de imediato foram precipitadas com 1/10 volume de acetato de sódio 3M e 2,5 volumes de etanol absoluto frio e armazenadas a -80°C.

1.4. Electroforese em gel de agarose

A visualização das amostras de RNA, e dos produtos de digestões e de PCR foi efectuada por electroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. Os géis foram preparados com tampão TAE 1X (Anexo I) contendo 1% de agarose (Invitrogen Life Technologies) dissolvida por aquecimento no microondas. A solução foi arrefecida até 50-60 °C e de seguida foi adicionado brometo de

etídio (Sigma), a uma concentração final de 0,5 µg/ml de gel; o gel foi vertido para uma tina com um “pente” com o número apropriado de pocetos. Após a polimerização do gel, as amostras foram misturadas com 10% volume de tampão de carregamento. Nas electroforeses de DNA foram também carregados 10 µg de marcador de peso molecular (1 Kb DNA ladder, Gibco BRL; GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use, MBI Fermentas; figura III.1) de modo a poder estimar o tamanho das bandas observadas no gel.

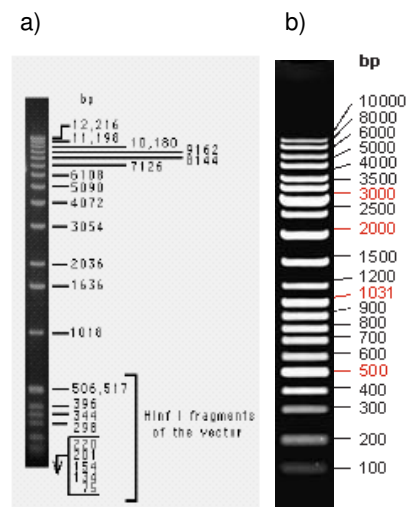


Figura III.1. Marcadores de peso molecular: a) 1 Kb DNA Ladder (0.5 µg/poço, gel agarose a 0.9%); b) GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use (gel agarose a 1.0%, 0.5µg/poço, 1X TAE, 17V/cm).

Para a migração das amostras aplicou-se uma voltagem de 100 V. No final da corrida, os géis foram examinados sob luz UV usando um transiluminador Vilber Loumat (I.L.C.- Instrumentos para Laboratório e Científicos, Lda) e foram analisados usando o programa BioCaptMW (Vilber Loumat; I.L.C.- Instrumentos para Laboratório e Científicos, Lda).

1.5. Síntese de cDNA

Os DNA complementares (cDNAs) usados na PCR foram preparados a partir do RNAt, que foi desnaturado a 65 °C durante 5 minutos. Foram usadas 5

µg de RNA para um volume de reacção de 30 µl contendo 2 µl de *random primers* (Invitrogen Life Technologies), 10 mM de dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech), tampão de enzima 5x concentrado, 40 U de inibidor de RNase (RNAguard™ RNase Inhibitor; Amersham Pharmacia Biotech) , 0,1 M de DTT e 200 U de transcriptase reversa do Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV RT). A transcriptase reversa usada (SuperScriptII™ Reverse Transcriptase) foi adquirida à Invitrogene Life Technologies e é fornecida com tampão de enzima (5x First-Strand Buffer) e DTT.

Após a reacção, que decorreu a 42 °C durante 50 minutos, a enzima foi inactivada a 70 °C durante 15 minutos e o cDNA foi armazenado a -20 °C.

1.6. Reacção em cadeia da polimerase (PCR)

Os fragmentos dos genes pretendidos foram amplificados num volume de reacção de 25 µl contendo 1x tampão PCR (Promega), 1,5 mM MgCl₂ (Promega), 0,2 mM de mistura de dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech), 50 pmol de cada *primer* (sintetizados pela Invitrogene, Inc.) e 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (Promega); a esta mistura foi adicionado 1 µl de cDNA sintetizado a partir do RNA_t extraído das gónadas. A amplificação ocorreu num termociclador Px2 (Thermo Hybaid). O número de ciclos e a temperatura de emparelhamento dos *primers* foram optimizados para cada caso.

1.7. Clonagem de cDNA e produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados a partir da mistura de reacção usando o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.).

Os cDNAs purificados foram depois clonados no vector pGEM-T Easy Vector (Promega) no local de restrição *EcoRI* (figura III.2).

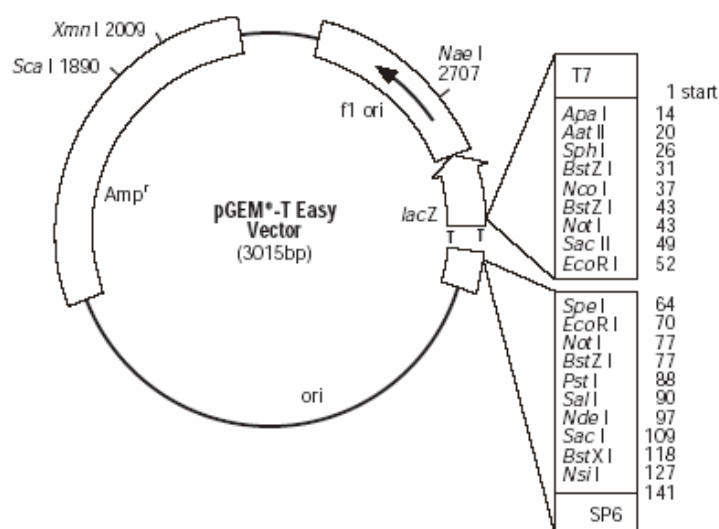


Figura III.2. Mapa do vector pGEM-T Easy . Adaptado de pGEM-T Easy Vector Technical Manual, Promega.

A ligação do cDNA ao vector foi feita num volume final de 10 µl de reacção contendo 3 µl de DNA purificado, 1 µl de vector (50 ng), 5 µl de tampão da T4 DNA ligase, concentrado 2x e 1 µl de T4 DNA ligase (3 U). A reacção decorreu “overnight”, a 4^o C.

Para a transformação foram usadas células competentes de *E. coli* estirpe XL1-Blue MRF' (Anexo II). Adicionaram-se os 10 µl da reacção de ligação a 100 µl de *E. coli* e incubou-se em gelo durante 30 minutos (no mínimo). De seguida, efectuou-se um choque térmico a 42 °C durante 2 minutos.

As células transformadas foram plaqueadas por espalhamento em placas de LB agar contendo IPTG (0,5 mM)/X-Gal (80 µg/ml) e ampicilina (100 µg/ml) (Anexo II), e incubadas a 37 °C overnight.

Os clones contendo *insert* (colónias brancas) foram repicados da placa para 3 ml de meio líquido LB Broth (Anexo I) com ampicilina, em condições estéreis e cresceram durante 14 -18 horas, a 37 °C, com agitação.

O DNA plasmídico foi extraído e purificado usando o kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega) seguindo as instruções do fabricante.

A presença de *insert* no vector foi confirmada digerindo o plasmídeo purificado com *EcoRI* durante 2 horas a 37 °C e analisando os produtos em géis de agarose. De seguida, os plasmídeos contendo o *insert* de interesse foram sequenciados para confirmação da identidade do clone.

1.8. Sequenciação e análise de sequências

Os plasmídeos foram sequenciados pelos serviços de sequenciação da firma STABVIDA, utilizando o método de Sanger recorrendo ao *primer* para o promotor T7 (figura III.2).

A identidade dos clones foi confirmada por análise de homologia com submissão das sequências ao BlastN (versão 2.2.10, National Center for Biotechnology Information, Altschul *et al.*, 1997).

1.9. Purificação de RNA poli (A)⁺

O RNA poli (A)⁺ foi purificado a partir de 1 mg de RNAt do grupo controlo e 1 mg de RNAt do grupo tratado obtidas a partir de uma mistura de RNAt de todos os animais de cada grupo. A purificação foi efectuada de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, usando o FastTrack[®] 2.0 Kit (Invitrogen Life Technologies), que se baseia na principal característica deste tipo de RNA, a poliadenilação.

Este kit remove o DNA e as proteínas da amostra e permite a ligação selectiva do RNA mensageiro (mRNA) à celulose oligo(dT), na presença de elevadas concentrações de sal. A resina é transferida para uma coluna de microcentrífuga e o RNA ribossomal (rRNA) é removido por lavagens com um tampão com baixa concentração de sal. O mRNA é eluído com um tampão de baixa força iónica.

Assim, as misturas de RNAt precipitado foram ressuspensas em tampão de eluição (10 mM Tris-Cl, pH 7,5 em água DEPC) num tubo de centrífuga de 50 ml,

desnaturadas pelo calor (5 minutos a 65 °C) e colocadas em gelo durante 1 minuto. Adicionou-se NaCl 5 M, misturou-se por inversão e juntou-se a resina oligo(dT). Incubou-se o RNAt com a resina à temperatura ambiente, com agitação, durante 30 minutos; em seguida centrifugou-se e descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o pellet em tampão de ligação (500 mM NaCl , 10 mM Tris-Cl, pH 7,5 em água DEPC), centrifugou-se e ressuspendeu-se novamente o pellet em tampão de lavagem com baixa concentração de sal (250 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7,5 em água DEPC). Fizeram-se várias lavagens com este tampão de modo a remover detergente e RNA contaminante, transferiu-se a resina para uma coluna de microcentrífuga e centrifugou-se. Descartou-se o tampão e repetiram-se as lavagens com o tampão de baixa concentração de sal. Transferiu-se a coluna para um tubo de microcentrífuga estéril e eluiu-se o mRNA com tampão de eluição. Precipitou-se o mRNA com 0,15 volumes de acetato de sódio 2 M e 2,5 volumes de etanol absoluto. Centrifugou-se a 4°C, removeu-se o etanol e ressuspendeu-se o mRNA em tampão de eluição. O mRNA não utilizado voltou a ser precipitado com 1/10 volume de acetato de sódio 3M e 2,5 volumes de etanol absoluto frio e armazenado a -80°C.

2. Identificação de genes diferencialmente expressos em resposta aos androgénios no testículo da dourada

2.1. Construção do banco de cDNA subtraído

O banco de cDNA subtraído foi constituído usando o kit Clonetch PCR-Select™ cDNA Subtraction (Clonetch) seguindo as instruções do fabricante. Esta técnica permite comparar duas populações de mRNA e obter clones de genes que são expressos numa população mas não na outra. Os mRNA, purificados a partir do RNAt, são convertidos em cDNA recorrendo a uma transcriptase reversa; o cDNA que contém os transcritos parcialmente expressos é designado por “tester” e o cDNA-referência é designado por “driver”. Estes cDNA são hibridados e os híbridos são removidos. Consequentemente, os cDNA não hibridados

representam genes que são expressos no “tester” mas que não existem no “driver” (figura III.3.).

Assim, e usando o kit acima referido, começou-se por sintetizar cDNA a partir de mRNA poli(A)⁺ extraído das gónadas de douradas pertencentes aos dois grupos de estudo (controlo e tratado com 11KT); ambos os cDNA foram digeridos com *Rsa* I, uma enzima que cria “blunt ends” (extremidades rombas).

O cDNA “tester” (neste caso, o grupo tratado) digerido foi dividido em duas porções, a cada qual se ligou um tipo diferente de adaptador de DNA (1 e 2R). Os dois tipos de adaptadores possuem sequências que permitem ligação dos *primers* fornecidos com o kit, após o preenchimento das extremidades desemparelhadas.

Foram efectuadas duas hibridações:

- na primeira, foi adicionado excesso de cDNA “driver” ao cDNA “tester”. As amostras foram desnaturadas, voltando a emparelhar e gerando diferentes tipos de moléculas.

- na segunda, as amostras hibridadas foram misturadas sem desnaturação, dando origem a um novo tipo de molécula – moléculas de cDNA_{ds} com extremidades diferentes, que correspondem aos adaptadores 1 e 2R. Em seguida foi adicionado cDNA “driver” desnaturado de modo a enriquecer a fracção de sequências diferencialmente expressas. Após o preenchimento das extremidades por uma DNA polimerase, as sequências “tester” diferencialmente expressas tinham locais de *annealing* para *primers nested* nas extremidades 3’ e 5’.

A população de moléculas expressas diferencialmente, e que contém ambos os adaptadores (1 e 2R), foi amplificada por PCR. Isto foi possível porque apenas as moléculas que contêm os dois tipos de adaptadores sofreram amplificação exponencial, uma vez que são apenas estas moléculas que possuem sequências de ligação aos *primers* (figura III.3).

Em seguida, uma nova amplificação por PCR foi executada usando *primers* “nested”; esta amplificação teve como objectivo aumentar a quantidade de sequências diferencialmente expressas, reduzindo os produtos de PCR indesejados. As reacções de PCR foram feitas utilizando o kit Advantage cDNA PCR (Clontech); em cada uma das reacções foi incluído um controlo positivo, fornecido com o kit, para assegurar que a enzima estava a actuar eficientemente.

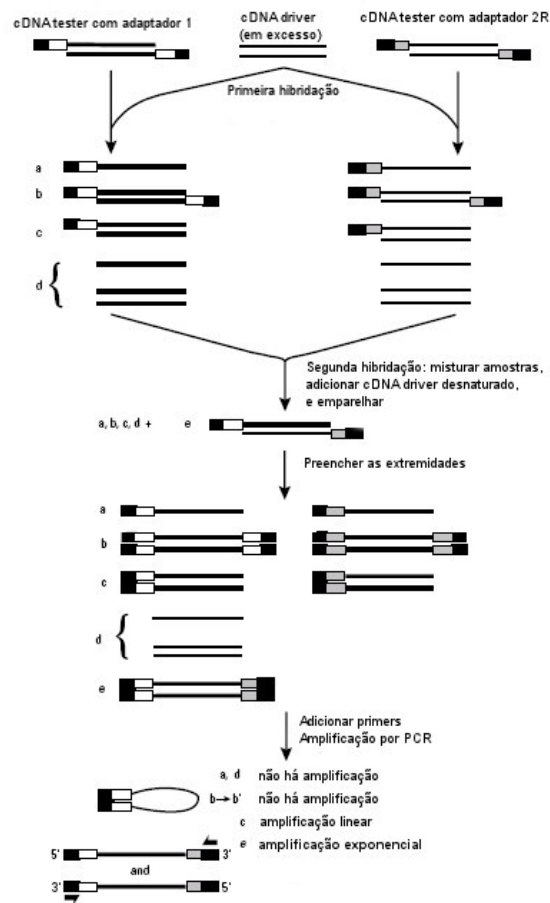


Figura III.3. Resumo esquemático da técnica de hibridação subtractiva. Adaptado de Clonetch PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit Technical Manual, Clonetch.

2.2. Clonagem e identificação dos genes diferencialmente expressos em resposta aos androgénios

O banco de cDNA obtido com a hibridação subtractiva foi directamente inserido num vector de clonagem T/A (pGEM-T Easy Vector; Promega).

Foram feitas várias ligações com diferentes ratios cDNA:vector de modo a obter o maior número de colónias brancas (colónias com plasmídeo contendo o *insert*). Em todas as ligações usou-se 1 µl de vector, variando apenas quantidade

de cDNA (ver tabela III.1). Nas ligações E e F o banco de cDNA subtraído foi diluído em água (Eurobio).

Tabela III.1. Ratios cDNA:vector usados nas diferentes ligações.

	Ligação A	Ligação B	Ligação C	Ligação D	Ligação E	Ligação F
Vector (µl)	1	1	1	1	1	1
cDNA (µl)	1	2	3	0,5	1 (dil. 1/3)	2 (dil. 1/3)

Após a ligação, transformaram-se as células de *E. coli* XL1-Blue, extraiu-se, purificou-se e digeriu-se o DNA plasmídico (ver ponto III.1.7.).

A identidade dos clones correspondendo a putativos genes diferencialmente expressos em resposta aos androgénios foi determinada por sequenciação (ver ponto III.1.8.).

2.3. Confirmação da expressão diferencial dos genes

Para confirmar que alguns dos genes isolados são diferencialmente expressos, isto é, que apenas estão presentes na gónada estimulada com 11 KT, efectuou-se uma análise por Northern blot. Para tal, 20 µg de RNA e 5 µg de marcador de peso molecular (RNA Ladder 0.24-9.5 Kb, Invitrogen; figura III.4) foram submetidos a electroforese em gel de agarose (1,5%)/formaldeído usando MOPS 1x como tampão de corrida. Pesaram-se 2 g de agarose, adicionaram-se 100 ml de água tratada com DEPC e aqueceu-se no microondas para dissolver. Deixou-se arrefecer um pouco, adicionaram-se 13,33 ml de MOPS 10x (Anexo I) e 20 ml de formaldeído a 37% (Sigma); o gel foi vertido para uma tina com um “pente” com o número apropriado de pocetos. Depois de solidificar, aplicaram-se as amostras previamente desnaturadas a 65 °C durante 5 minutos com uma solução desnaturante contendo formamida (Sigma) a uma concentração final de 75% (p/v), formaldeído (37%) a uma concentração final de 2,4 M, MOPS 10X a uma concentração final de 1,3X e brometo de etídio a uma concentração final de 3,3 µg/ml.

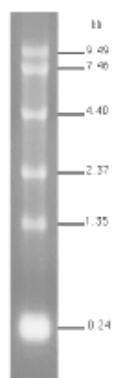


Figura III.4. Marcador de peso molecular RNA Ladder 0.24-9.5 Kb (3 µg/poço, gel 1.2% agarose, corado com brometo de etídio).

Após a electroforese, o gel foi fotografado e de seguida coberto com uma membrana de nitrocelulose (Hybond-N, Amersham) e colocado no sistema de transferência (figura III.5); o RNA foi transferido “overnight” (no máximo 16 horas) utilizando 10x SSC (Anexo I) como tampão de transferência.

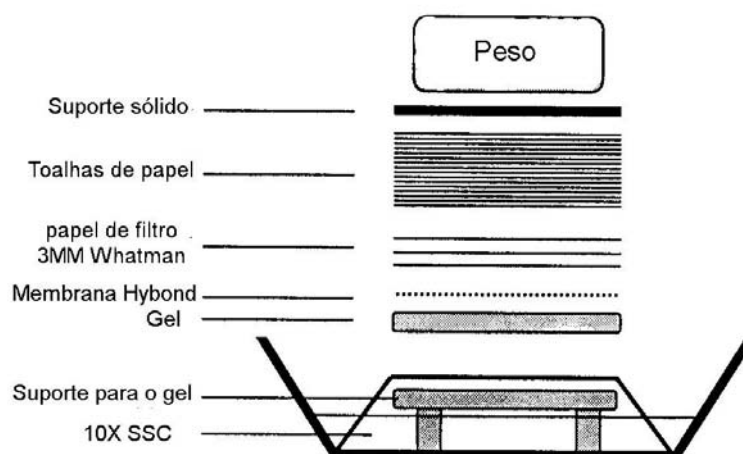


Figura III.5. Montagem utilizada para transferência de RNA do gel para a membrana de nitrocelulose. Adaptado de Socorro, S. (2001).

O RNA foi fixado à membrana por exposição à luz ultravioleta (120 000 µJ durante 30 segundos) num UV “crosslinker” (UVC 500 UV Crosslinker, Hoefer). A membrana foi guardada em papel 3MM Whatman até à hibridação com a sonda.

As sondas foram obtidas por digestão dos plasmídeos contendo os fragmentos dos genes cuja expressão se pretendia confirmar. Após a digestão do plasmídeo com *EcoRI* (37°C, aproximadamente 2 horas), a banda correspondente ao fragmento do gene foi excisada do gel e purificada utilizando o kit Wizard Gel and PCR Clean-up System (Promega). De modo a confirmar que a purificação foi bem sucedida, foi feita uma electroforese em gel de agarose aplicando 10 µl de cada purificação em cada poceto.

A sonda foi marcada com [α -32P]-dCTP usando o kit Rediprime™ II DNA Labeling System (Amersham Biosciences). Após a marcação, os nucleótidos não incorporados foram removidos usando as microcolunas ProbeQuant™ G-50 (Amersham Biosciences). Para verificar a marcação da sonda foram adicionados 40 µl de líquido de cintilação a 1µl de DNA marcado, em microplacas, e foram medidas as cintilações por minuto (cpm) no aparelho TopCount NXT™ (Packard).

A sonda foi adicionada à solução de hibridação (5x SSC, 5x Denhardt's (Anexo II), 0,1% SDS e 50 µg/ml Calf Thymus DNA (Sigma)) numa concentração de cerca de $0,5 \times 10^6$ cpm/ml, após pelo menos 2 horas de pré-hibridação da membrana, a 65°C, com a mesma solução.

A hibridação decorreu “overnight”, a 65°C com rotação. De seguida, foi feita uma lavagem com 2x SSC/0,1 % SDS a 65°C durante 30 minutos, uma lavagem com 1x SSC/0,1% SDS a 65°C durante 30 minutos e várias lavagens com 0,1x SSC/0,1% SDS a 65°C durante períodos de 15 minutos. As soluções de lavagem foram pré-aquecidas a 65° C.

As membranas foram colocadas dentro de sacos de plástico e colocadas em exposição durante 25 horas. A análise foi efectuada utilizando o sistema Molecular Imager FX Pro Plus Multilmager e o respectivo software Quantity One™ (Bio-Rad).

3. Análise da expressão do receptor de androgénios e dos receptores de estrogénios

3.1. PCR semi-quantitativo

De modo a estudar a expressão do AR e dos ERs fizeram-se reacções de PCR com *primers* específicos para os referidos receptores (tabela III.2).

Tabela III.2. Características dos *primers* específicos para o receptor de androgénios, receptores de estrogénios e 18S, usados nas reacções de PCR: sequência, tamanho do fragmento amplificado e ciclo de PCR.

Primers	Sequência	Fragmento	Ciclo PCR
AR	"forward" 5'-ATCCCAACTCCAGCTACGTG-3'	251pb	94°C: 2 min 94°C: 40 seg 55°C: 30 seg 72°C: 50 seg 72°C: 5 min
	"reverse" 5'-ATTTTGTCTTGCGCATAGGT-3'		
ER α	"forward" 5'-CCCATCCAGTCAGCATTCA-3'	374 pb	94°C: 3 min 94°C: 40 seg 57°C: 30 seg 72°C: 50 seg 72°C: 5 min
	"reverse" 5'-TTGTCACGCCGCGAGAACG-3'		
ER β 1	"forward" 5'-GCTGATGATCGGACTTGAATGTG-3'	348 pb	94°C: 3 min 94°C: 40 seg 59°C: 30 seg 72°C: 50 seg 72°C: 5 min
	"reverse" 5'-GGTGTACTGTTGGCGGAAAG-3'		
ER β 2	"forward" 5'-TGATGATGTCACTCACCAACC-3'	291 pb	94°C: 3 min 94°C: 40 seg 54°C: 30 seg 72°C: 50 seg 72°C: 5 min
	"reverse" 5'-TTCAGCTCACGAAACCGA-3'		
18S	"forward" 5'-TCAAGAACGAAAGTCGGAGG-3'	495 pb	94°C: 2 min 94°C: 45 seg 59°C: 30 seg 72°C: 45 seg 72°C: 5 min
	"reverse" 5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-3'		

Os *primers* para os ER foram cedidos por Pinto, P. (sem data), tendo sido desenhados nos domínios menos conservados da proteína para aumentar a sua especificidade. Os *primers* para o AR foram desenhados na sequência obtida por Socorro, S. (dados não publicados) usando o software Primer3

(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi); os *primers* “forward” e “reverse” localizam-se respectivamente nos domínios A/B e DBD.

A mistura de reacção foi preparada como explicado no ponto III.1.6.; a amplificação ocorreu num termociclador Px2 (Thermo Hybaid) segundo os programas descritos na tabela III.2..

O gene para o RNA 18S foi escolhido como gene normalizador por ser um “housekeeping gene”, isto é, um gene cuja expressão é constante, não sendo influenciada pelo tratamento com 11KT.

O número de ciclos de PCR para cada par de *primers* foi optimizado de modo a garantir que a reacção estava a decorrer na fase exponencial da amplificação. As amostras foram analisadas em triplicado para minimizar a variabilidade inerente à própria reacção de PCR e à manipulação pelo investigador.

Os produtos de PCR obtidos foram clonados (ponto III.1.7.) e sequenciados (ponto III.1.8.) de modo a confirmar a identidade do fragmento amplificado.

A expressão de cada receptor em cada amostra foi normalizada com a expressão do 18S; os volumes das respectivas bandas foram quantificados utilizando o programa BioID (Vilber Loumat; I.L.C.- Instrumentos para Laboratório e Científicos, Lda), de modo a permitir uma análise semi-quantitativa da expressão dos receptores, minimizando a variabilidade individual na expressão de cada gene. Efectuou-se ainda uma análise adicional em que se agruparam os indivíduos consoante a proporção relativa de testículo na gónada e determinaram-se os valores médios da expressão dos receptores.

De modo a verificar se existiam diferenças significativas na expressão dos receptores entre os grupos efectuou-se uma ANOVA com um valor de significância inferior a 0,05.

IV. RESULTADOS

1. Efeito do tratamento com 11-cetotestosterona

1.1. Níveis plasmáticos de 11-cetotestosterona e estradiol

A administração de 11KT levou a um aumento dos níveis de ambos os esteróides no plasma, como se pode observar na figura IV.1. Os níveis médios de 11KT passaram de 4,83 ng /ml de plasma (grupo controlo) para 5,59 ng/ ml de plasma (grupo tratado). Em relação ao E₂, também se verificou um aumento, passando os valores plasmáticos de 4,22 ng/ml no grupo controlo para 4,95 ng/ml no grupo tratado. A análise estatística efectuada não revelou diferenças significativas entre os dois grupos.

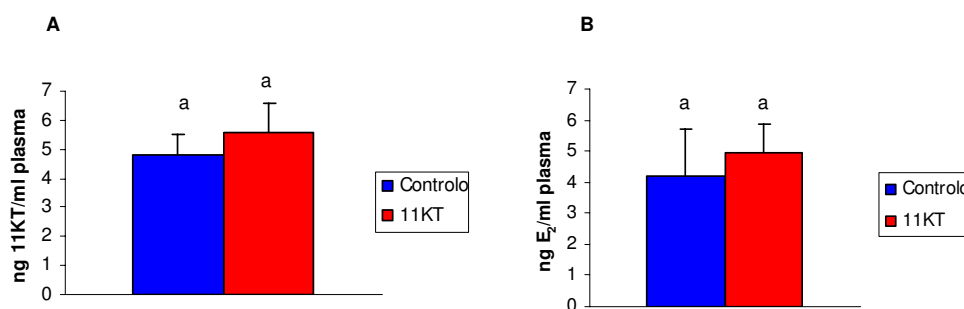


Figura IV.1. Variação dos níveis plasmáticos de 11KT e E₂ determinados por RIA em resposta ao tratamento com 10 mg 11KT/kg peso corporal. Cada barra indica média \pm SEM (n=8). a - grupos não significativamente diferentes (p<0,05).

1.2. Índice gonadossomático

A figura IV.2 mostra que o IGS aumentou em resposta ao tratamento com 11KT. O valor médio do IGS do grupo controlo é de 0,16 enquanto que o valor médio do IGS do grupo tratado com 10 mg de 11KT /kg de peso corporal é de 0,24, variação que a análise estatística mostrou ser significativamente diferente.

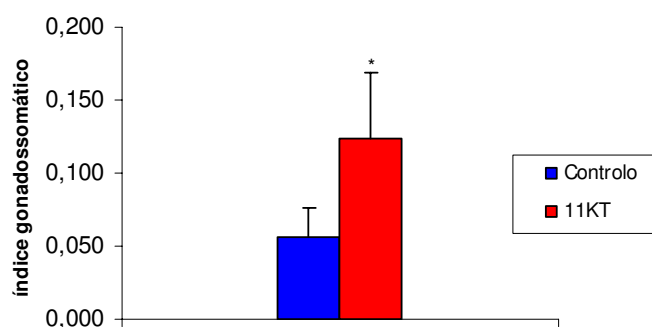


Figura IV.2. Variação do índice gonadosomático em resposta ao tratamento com 10 mg 11KT/kg peso corporal. Cada barra indica média \pm SEM (n=8). * indica significativamente diferente ($p < 0,05$).

1.3. Proporção de testículo na gónada

Verificou-se, tal como ilustrado na figura IV.3. que o número de indivíduos com uma percentagem de gónada masculina superior a 25% é maior no grupo tratado com 11KT, enquanto que o número de indivíduos com uma percentagem de gónada masculina inferior a 25% é menor neste grupo, quando comparado com o grupo controlo.

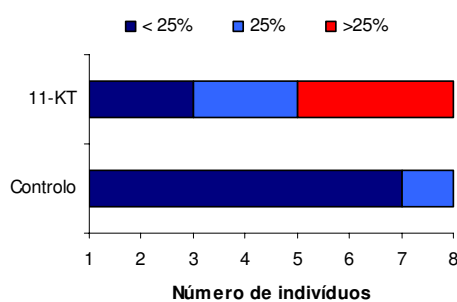


Figura IV.3. Proporção relativa de tecido testicular nas gónadas de dourada determinada por análise macroscópica, em resposta ao tratamento com 10 mg 11KT / kg peso corporal.

2. Identificação de genes diferencialmente expressos em resposta aos androgénios na gónada

A figura IV.4. mostra o resultado da electroforese do banco de cDNA subtraído obtido pela técnica de hibridação subtractiva.

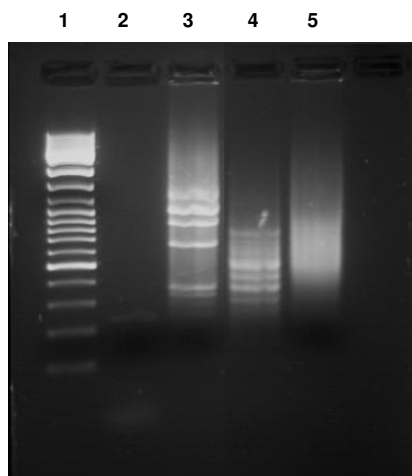


Figura IV.4. Resultado da electroforese do banco de cDNA obtido por hibridação subtractiva. 1 - GeneRuler™ DNA Ladder Mix; 2 – controlo negativo (não foi adicionado cDNA à reacção de PCR); 3 – controlo positivo fornecido com o kit Advantage cDNA PCR; 4 – hibridação “forward” (foi utilizado o cDNA do grupo controlo como “driver”); 5 – controlo não subtraído (cDNA “tester” com ambos os adaptadores 1 e 2R).

Os produtos observados na linha 4 correspondem aos genes que são expressos no grupo tratado mas não no grupo controlo e constituem, deste modo, o banco de cDNA subtraído contendo os genes diferencialmente expressos em resposta ao tratamento com 11KT.

Do total das ligações efectuadas (ponto III.2.2.) isolaram-se 58 clones com tamanhos entre os 150 e os 800 pb (figura IV.5).

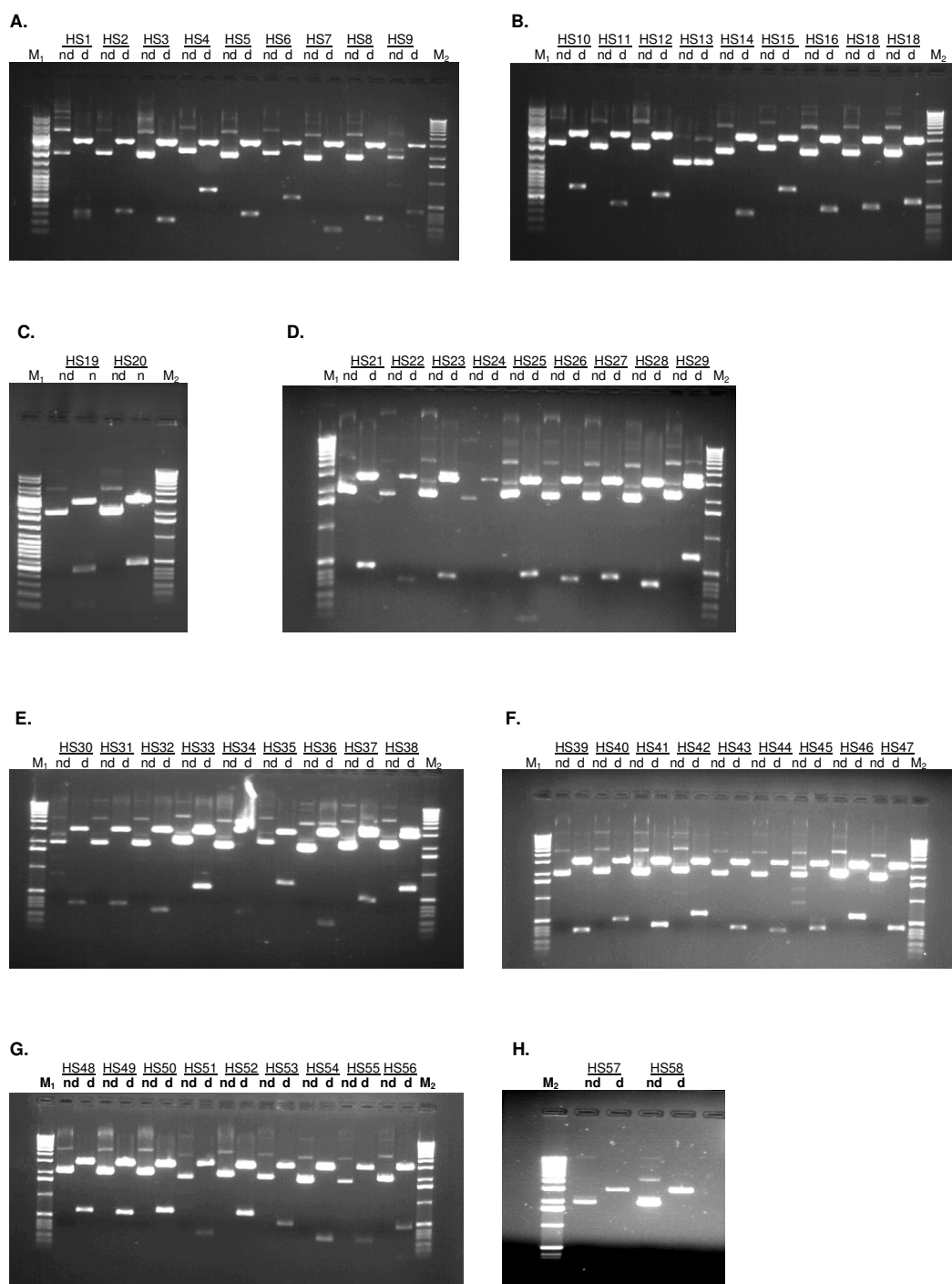


Figura IV.5. Plasmídeos isolados do banco de cDNA obtido pela técnica de hibridação subtrativa. M₁ - GeneRuler™ DNA Ladder Mix; M₂ - 1 Kb DNA Ladder; nd - não digerido; d - digerido com EcoRI; HS1 a HS 58 - nome dos clones. A - H - eletroforeses mostrando o tamanho dos diferentes *inserts*.

Após digestão dos plasmídeos e confirmação da presença de *insert*, seleccionaram-se 54 clones para sequenciar. Os restantes não foram sequenciados uma vez que a digestão com *EcoRI* não revelou a presença de *insert* (clones HS13, HSS24, HS34 e HS57). A sequenciação revelou a identidade dos diversos genes isolados cujos resultados são apresentados na tabela IV.1. Os genes identificados correspondem a proteínas com funções diversas, como metabolismo, síntese e secreção de proteínas. Dos 54 clones sequenciados, 36 não apresentavam homologia com genes conhecidos.

Tabela IV.1. Genes diferencialmente expressos na gónada da dourada em resposta ao tratamento com 11KT isolados por hibridação subtractiva; os genes estão agrupados por funções e a sua identidade foi atribuída de acordo com homologia de sequências obtidas no Blast. Valor E – “expected value”; ? – função desconhecida.

Função	Nome do gene	Valor E
Metabolismo	quinona reductase (<i>Oryzias latipes</i>)	8e-69
	NAD(P)H desidrogenase (quinona) (<i>Platichthys flesus</i>)	1e-46
	glucose fosfato isomerase (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	0.014
	<i>Homo sapiens</i> esteróide-5- α -reductase (3-oxo-5- α -esteróide Δ -4-desidrogenase α 2) (SRD5A2)	7.7
	Carboxilesterase (<i>Sus scrofa</i>)	0.022
	Catepsina S (<i>Oryzias latipes</i>)	8e-24
Proteínas estruturais	Proteínas de choque térmico 70 (HSP70) (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	7.7
	Proteína de choque térmico 70 (<i>Pagrus major</i>)	7.7
	β -tubulina (<i>Notothenia coriiceps</i>)	e-131
Síntese proteica	Proteína ribossomal 40s S27a (<i>Epinephelus coioides</i>)	e-112
	Proteína ribossomal 40S S27A (<i>Pseudopleuronectes americanus</i>)	9e-97
	Proteína ribossomal 40S S27A (<i>Ictalurus punctatus</i>)	2e-82
Proteínas secretadas	IGF-1 (<i>Sebastes schlegeli</i>)	7.7
	Receptor factor de crescimento de fibroblastos (FGF) (<i>Danio rerio</i>)	0.098
Diversos	<i>Oreochromis mossambicus</i> small EDRK factor - rich 2-like	5e-16
	Poliubiquitina (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	4e-9
	Percursor receptor α interleucina-5 (<i>Cavia porcellus</i>)	0,04
	Factor nuclear kapa B (NFkB) (<i>Rattus norvegicus</i>)	9e-05

A expressão diferencial de alguns dos genes isolados, nomeadamente a proteína ribossomal S27, a quinona reductase e a catepsina S, foi confirmada por Northern blot (figura IV.6); verificou-se que houve um aumento de expressão dos genes em resposta ao tratamento com 11KT.

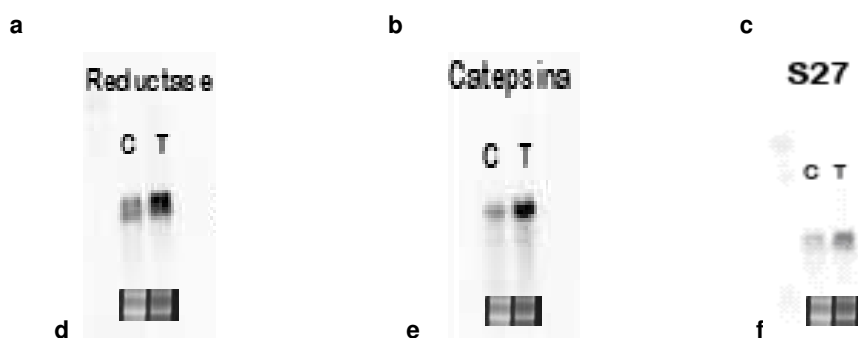


Figura IV.6. Efeito do tratamento com 11KT na expressão dos genes da quinona reductase (a), da catepsina S (b) e da proteína ribossomal S27a (c) analisado por Northern blot. 20 µg de RNA total da gónada foram hibridados com sondas específicas para cada um desses genes marcadas com [α - 32 P]dCTP. d - f, electroforese do RNA antes da transferência para a membrana, mostrando as quantidades que foram aplicadas nos poços do gel. C – grupo controlo; T – grupo tratado com 11KT.

3. Expressão do receptor de androgénios e dos receptores de estrogénios

A análise da expressão do AR e dos ERs efectuou-se por RT-PCR semi-quantitativo usando *primers* específicos para cada receptor. O gene para o rRNA 18S foi amplificado nas mesmas amostras que foram analisadas para os receptores, funcionando como um controlo interno e servindo para demonstrar as diferenças na expressão dos receptores nos diferentes indivíduos.

Os resultados (figura IV.7 e figura IV.8) mostram que existem diferenças ligeiras na expressão dos diferentes receptores, em resposta ao tratamento com 11KT; a expressão do AR parece ser maior no grupo tratado com o esteróide do que no grupo controlo, enquanto que a expressão dos ERs parece ser maior no grupo controlo do que no grupo tratado. Todavia, em qualquer dos casos, estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

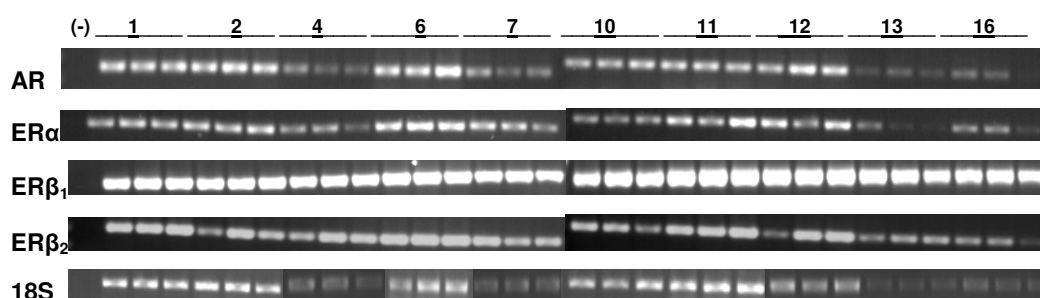


Figura IV.7. RT-PCR mostrando a expressão do AR, ER α , ER β 1 e ER β 2 nas gónadas de dourada após 2 semanas de tratamento com 11KT (10 mg/kg peso corporal); 1-7: grupo controlo; 10-16: grupo tratado; (-): controlo negativo (não foi adicionado cDNA à reacção de PCR). O gene 18S foi usado como controlo de expressão.

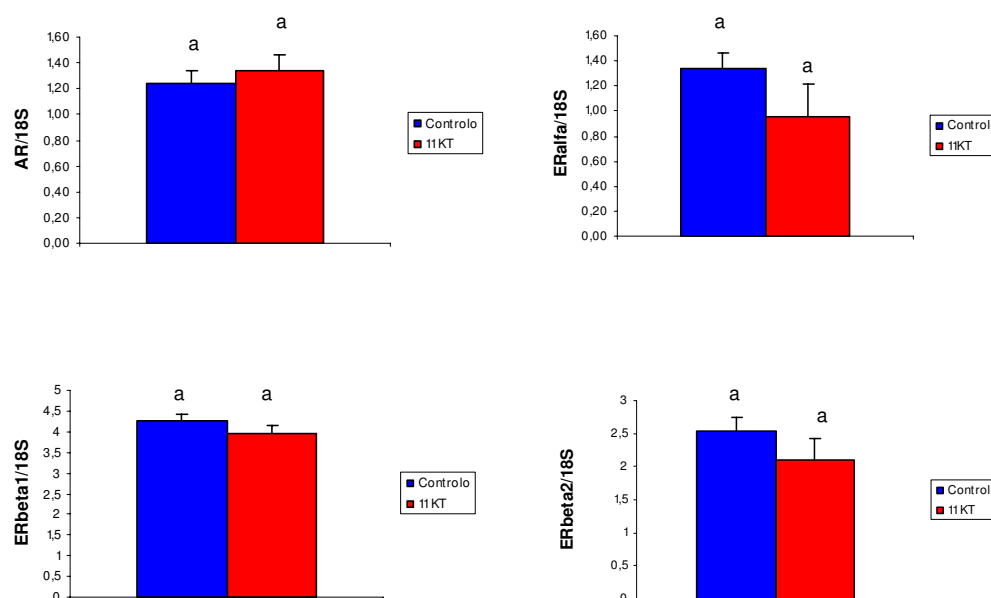


Figura IV.8. Expressão dos diferentes receptores nas gónadas de dourada em resposta ao tratamento com 10 mg 11KT/kg peso corporal durante 2 semanas ; os níveis de expressão foram normalizados em relação aos níveis de expressão do 18S. Cada barra indicada média \pm SEM (n=5). a - grupos não significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Os resultados da expressão dos diferentes receptores foram agrupados consoante a proporção de testículo na gónada. Os gráficos da figura IV.9 mostram que não existem alterações marcadas na expressão dos diferentes receptores em função da proporção relativa de testículo na gónada, não se observando diferenças estatisticamente significativas.

A expressão do AR, ER β 1 e ER β 2 permanece mais ou menos constante e apenas para o ER α parece haver uma tendência para ocorrer uma diminuição da expressão quando aumenta a proporção de testículo.

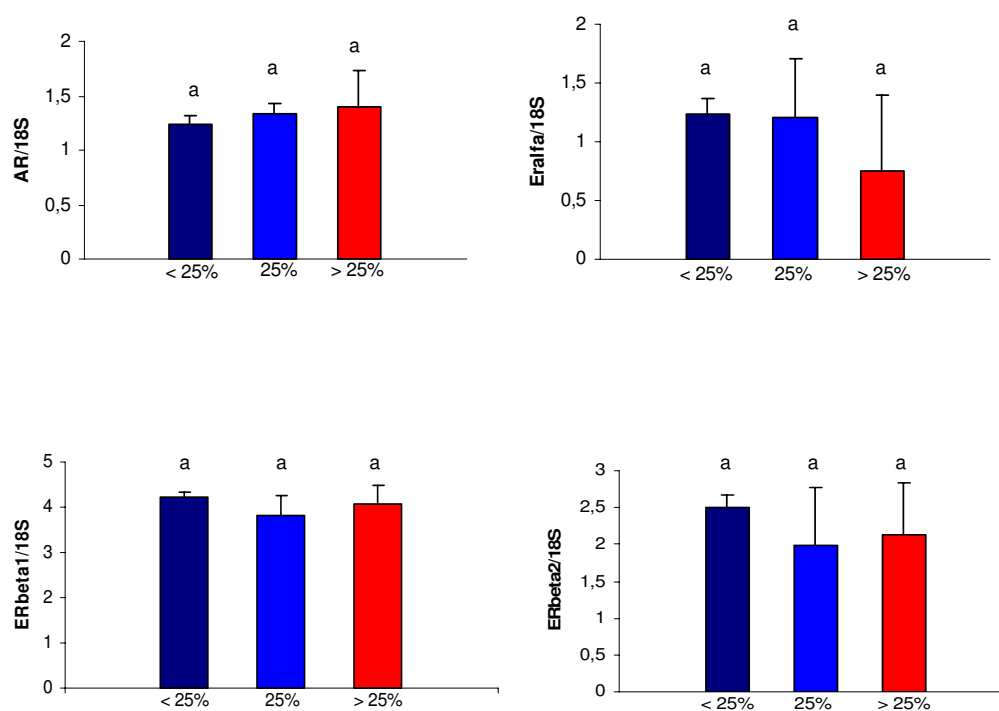


Figura IV.9. Expressão dos diferentes receptores em função da proporção de testículo na gónada da dourada. A expressão de cada receptor foi normalizada em relação aos níveis de expressão do 18S. Cada barra indica média \pm SEM (n=8). a - grupos não significativamente diferentes (p<0,05).

V. DISCUSSÃO

1. Efeitos do tratamento com 11-cetotestosterona no índice gonadossomático e na proporção de testículo na gónada da dourada

No presente trabalho, o IGS e a proporção do testículo na gónada aumentaram com o tratamento com 11KT (figuras IV.2 e IV.3); embora o aumento dos níveis plasmáticos de 11KT relativamente ao controlo não seja significativo estes efeitos poderão, contudo, ser resultado da estimulação hormonal, pois o pico máximo poderá ter ocorrido antes das 2 semanas. Em condições de maturação sexual natural, o pico de 11KT ocorre nas fases iniciais da espermatogénese, tal como foi demonstrado por Mylonas e colaboradores (1997). Deste modo, e uma vez que a proporção de testículo na gónada é maior no grupo tratado com 11 KT, e que este grupo é também o que apresenta maior IGS, pode-se dizer que houve uma indução da masculinização da gónada.

Os estudos que mostram a masculinização da gónada pelo tratamento hormonal com androgénios noutras espécies de telósteos têm vindo a ser publicados desde há vários anos, e encontram-se referências em truta (Baroiller *et al.*, 1998; Kusakabe, *et al.*, 2002; Young *et al.*, 1996;), salmão (Piferrer *et al.*, 1993; Ueda *et al.*, 1983), peixe-gato africano (Cavaco, 1998), peixe japonês do arroz (Seki *et al.*, 2004) e lúcio (*Esox masquinongy*; Rinchard *et al.*, 1999).

Relativamente aos níveis plasmáticos de E_2 verificou-se que houve um aumento, embora não significativo e constatou-se ainda que o ratio $E_2/11KT$ é semelhante em ambos os grupos (controlo e tratado). Em princípio, este resultado não seria esperado, dado que em espécies protogínicas aquando da inversão sexual ocorre um aumento dos níveis de 11KT e uma diminuição significativa dos níveis de E_2 (Cardwell & Liley, 1991; Nakamura *et al.*, 1989). Em contraste, nas espécies protândricas, no período de inversão sexual parece ocorrer um aumento dos ratios estrogénios/androgénios (Godwin & Thomas, 1993). Em *Sparidentex hasta*, foi observado um pico nos níveis plasmáticos de E_2 nos machos que sofriam inversão sexual. Nos indivíduos que não sofriam inversão, os níveis de E_2 diminuía e os níveis de androgénios 11-oxigenados aumentavam; os indivíduos que passavam a fêmeas exibiam níveis altos de E_2 e baixas concentrações de androgénios 11-oxigenados. Estes resultados sugerem que a inversão sexual

ocorre quando a concentração de estrogénios secretados pela parte ovárica da gónada mista atinge um determinado limiar (Kime *et al.*, 1991).

No presente estudo, embora não se tenham observado variações significativas nos níveis e ratios hormonais, foi possível identificar respostas à 11KT na gónada, quer ao nível morfológico, quer molecular (ver discussão no ponto seguinte), o que pode significar que as alterações determinantes para a masculinização começam a ocorrer em consequência imediata do aumento da 11KT e só mais tarde surge a diminuição dos níveis de E_2 .

2. Genes diferencialmente expressos em resposta ao tratamento com 11-cetotestosterona na gónada da dourada

No presente trabalho foram isolados e identificados genes diferencialmente expressos em resposta ao tratamento com 11KT, alguns dos quais já referidos em bibliografia como genes diferencialmente expressos em resposta aos androgénios, nomeadamente o gene que codifica para a proteína ribossomal S27a e o gene que codifica para o factor de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1; Blum *et al.*, 2004; Jiang & Wang, 2003).

A expressão diferencial em resposta à 11KT foi confirmada para os genes que codificam para a NAD(P)H:quinona reductase, para a catepsina S e para proteína ribossomal S27a, os quais serão a base da discussão que se segue.

A NAD(P)H:quinona reductase é uma flavoproteína com actividade enzimática, envolvida na biossíntese de esteróides, mais concretamente na síntese de vitamina K. A quinona reductase é uma enzima de destoxificante de fase II (Ansell *et al.*, 2004) estando envolvida na defesa contra espécies reactivas de oxigénio e na inibição de neoplasias; a sua expressão está aumentada em situações de stress oxidativo, o que confere protecção contra factores ambientais nefastos. Essa protecção é exercida a vários níveis: redução e destoxificação de quinonas reactivas, manutenção dos antioxidantes lipossolúveis endógenos na forma reduzida (activa) e estabilização da proteína p53, envolvida na resposta aos danos no DNA (Nioi & Hayes, 2004). Os metabolitos de estrogénios

(catecolestrogénios) podem provocar danos oxidativos no DNA e a quinona reductase inibe esses danos através da destoxificação de catecolestrogénios reactivos (Bianco *et al.*, 2003).

Em linhas celulares cancerosas tem sido demonstrado que a expressão da quinona reductase é induzida pelo ER, um efeito mediado pela ligação a antiestrogénios e que terá como consequência a protecção das células contra danos no DNA (Bianco *et al.*, 2003; Montano *et al.*, 2004). Considerando o papel dos androgénios no desenvolvimento de patologias malignas como o cancro da próstata (Debes *et al.*, 2004; Ntais *et al.*, 2003) é difícil explicar no contexto anterior a expressão da quinona reductase em tecidos do sistema reprodutor humano, nomeadamente nas células de Leydig e no epitélio do epidídimo, onde é bastante elevada (Zappa *et al.*, 2001).

Considerando que no presente estudo a 11KT induziu um aumento da expressão da quinona reductase, isto poderá indicar que os androgénios, para além da função de regulação da espermatogénese, poderão também ter um efeito protector sendo responsáveis por controlar a toxicidade selectiva dos tecidos do aparelho reprodutor que terá consequências ao nível da produção de T e/ou infertilidade.

Outro gene identificado como diferencialmente expresso em resposta ao tratamento com 11KT foi a catepsina S. É uma cisteína protease pertencente à super-família da papaína (Liu & Spero, 2004) que engloba endo e exopeptidases envolvidas em diversos processos como cancro, apresentação de antígenos e resposta imunitária, e controlo da osteoporose (Driessen *et al.*, 1999; Podgorski & Sloane, 2003). A catepsina S está relacionada com danos nos tecidos associados à resposta inflamatória (Kirschke *et al.*, 1989; Shi *et al.*, 1992) e está envolvida na angiogénese (Shi *et al.*, 2003). A catepsina S é muito semelhante à catepsina L, apresentando um grau de homologia de 49 % entre os seus aminoácidos (Shi *et al.*, 1994). São as duas únicas cisteínas proteases com actividade de degradação da elastina, mas a catepsina S difere da catepsina L na sua estabilidade e actividade *in vitro* em pH neutro (Kirschke *et al.*, 1989; Shi *et al.*, 1992). Verificou-se em ratinhos que a inactividade da catepsina L está associada a anomalias na espermatogénese, parecendo ser importante para prevenir a atrofia dos tubos

seminíferos e promover a formação e diferenciação dos espermátócitos (Wright *et al.*, 2003). Para além disso foi demonstrado que a síntese da catepsina L é induzida pela T (Karzai *et al.* 1992). Com base na semelhança estrutural que apresenta com a catepsina L e no facto da sua expressão também ser induzida pelos androgénios, sugere-se que a catepsina S poderá também desempenhar uma acção importante no processo de espermatogénese.

Outro dos genes induzidos pela 11KT na gónada da dourada foi a proteína ribossomal S27. Primeiramente identificada como uma proteína ribossomal com domínio “zinc-finger” semelhante ao dos factores de transcrição (Chan *et al.*, 1993), mais tarde foi definida como metaloproteína 1 e usada como marcador tumoral (Fernandez-Pol *et al.*, 1996; Fernandez-Pol, 1997). Recentemente, foi sugerida a sua acção como reguladora da estabilidade dos transcritos de RNA e degradação do RNA danificado (Revenkova *et al.*, 1999). Esta proteína já foi identificada como diferencialmente expressa em resposta aos androgénios no fígado do achigã (Blum *et al.*, 2004) e na próstata de rato (Jiang & Wang, 2003). Estudos de hibridação *in situ* realizados no hipotálamo de rato revelaram que a proteína S27 apresenta uma expressão distinta nos diversos núcleos hipotalâmicos (Thomas *et al.*, 2000). A literatura existente não documenta a expressão desta proteína nos testículos ou ovário, mas dada a multiplicidade de funções extra-ribossomais que lhe são apontadas, e com base nos resultados apresentados neste trabalho, sugere-se que pode ter funções importantes mediadas pelos androgénios na espermatogénese, e eventualmente na oogénese em vertebrados.

No presente trabalho foram ainda identificados outros genes cuja expressão em resposta à 11KT não foi confirmada; no entanto, caso esta se confirme, o seu envolvimento na fisiologia da gónada merece também ser estudado.

3. Efeito do tratamento com 11-cetotestosterona na expressão dos receptores de androgénios e estrogénios

A administração de 11KT levou a um ligeiro aumento da expressão do AR no grupo tratado, enquanto que a expressão dos diferentes receptores de ER se manteve mais elevada no grupo controlo (figura IV.8); no entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

A indução do AR pelo próprio ligando é um resultado já anteriormente descrito em células de Leydig imaturas (Shan *et al.*, 1997), na próstata ventral (Suzuki *et al.*, 1997) e tracto genital de rato (Bentvelsen *et al.*, 1995), assim como nos neurónios motores (Drengler *et al.*, 1997). Contrariamente, outro estudo revela que na maioria dos tecidos e linhas celulares que contém AR, a expressão do mRNA deste receptor diminui em resposta aos androgénios (Braunstein *et al.*, 1995). Actualmente foram já identificados os ARES envolvidos na indução da expressão do AR em resposta aos androgénios (Dai & Burnstein, 1996; Grad *et al.*, 1999), uma situação única já que estes se localizam em sequências exónicas e requerem a interacção com proteínas da família *myc* (Grad *et al.*, 1999). Embora o significado fisiológico destas sobre- e sub-regulação não esteja completamente compreendido, indica a existência de uma multiplicidade de respostas específicas para esse tecido, o que determinará a sua sensibilidade celular aos androgénios. Assim, embora as variações não sejam significativas, pode de facto estar a ocorrer a modulação da expressão do receptor em resposta à 11KT.

Relativamente à percentagem relativa de testículo na gónada, a expressão dos diferentes receptores também não apresentou diferenças significativas, e de facto também na literatura disponível se encontram referências em que o sexo da gónada não reflecte diferenças importantes ao nível da expressão dos receptores. No budião (*Halichoeres trimaculatus*), hermafrodita protogínico, as expressões do AR e do ER não apresentam diferenças significativas quando comparadas entre fêmeas, machos transicionais e machos terminais (Kim *et al.*, 2002). Por outro lado, ao longo da inversão sexual do pargo, hermafrodita protândrico, não há variação na expressão do ER α entre machos funcionais e peixes bissexuais; no entanto, a expressão ovárica do receptor diminui bastante no ovário pós-vitelínico

(Lee *et al.*, 2001). Também na truta arco-íris se verificou não existirem diferenças significativas na expressão do ER α antes e depois da diferenciação da gónada masculina (Baroiller *et al.*, 1999).

Os resultados do presente estudo, bem como a literatura existente, demonstram que existe uma acção importante de ambos os grupos de esteróides, estrogénios e androgénios, quer no desenvolvimento do testículo quer do ovário. No entanto, a sua acção não se traduz em diferenças importantes ao nível da expressão dos receptores. Kawamura e colaboradores (2003) tinham de facto sugerido que o papel do ER na determinação do sexo da gónada devia ser reconsiderado, uma vez que exemplares transgénicos do peixe japonês do arroz, sub-expressando o ER apresentavam a mesma taxa de inversão sexual que os animais não modificados, após o tratamento com estrogénios ou androgénios.

Os efeitos determinantes podem estar relacionados com ratios hormonais entre androgénios e estrogénios, os quais serão determinados pelas enzimas esteroidogénicas. A expressão da enzima 11 β OH parece ser determinante para a diferenciação da gónada masculina (Socorro *et al.*, dados não publicados) enquanto que o desenvolvimento do ovário estará dependente da expressão da aromatase (Guigen *et al.*, 1999).

VI. CONCLUSÃO

Está perfeitamente estabelecido que os esteróides sexuais desempenham um papel importante na diferenciação sexual, na maturação sexual e no comportamento, e que os androgénios induzem a masculinização das gónadas, estimulando a espermatogénese. Embora todos estes processos estejam bem documentados sob o ponto de vista fisiológico, pouco se sabe acerca das vias que lhes estão subjacentes.

O presente estudo pretende essencialmente contribuir para a elucidação dos processos moleculares dependentes dos androgénios na gónada da dourada. Os peixes são um bom modelo para experiências de estimulação com esteróides sexuais pois são muito sensíveis a compostos exógenos; assim, de modo a dar resposta aos objectivos propostos, procedeu-se à realização de uma experiência de tratamento com 11KT, um androgénio 11-oxigenado não aromatizável e o principal androgénio activo nos peixes. Embora os animais em estudo possuissem já uma gónada mista, foi possível verificar um aumento da proporção de testículo na gónada e um aumento significativo do IGS, podendo-se afirmar que, efectivamente, a 11KT induziu a masculinização da gónada. Esta afirmação é também sustentada pelo facto de alguns dos genes diferencialmente expressos em resposta ao tratamento com 11KT que foram isolados terem já sido referenciados como genes induzidos pelos androgénios. Outros identificados aqui pela primeira vez estão envolvidos em processos metabólicos e na síntese proteica, o que já tinha sido constatado noutros estudos de identificação de genes-alvo para os androgénios.

Foram confirmados como diferencialmente expressos os genes da proteína ribossomal S27, da quinona reductase e da catepsina. Relativamente à proteína ribossomal S27, parece importante estudar a sua expressão no testículo e/ou ovário uma vez que parece apresentar uma multiplicidade de funções extra-ribossomais, e deste modo poder-se-á aumentar o conhecimento existente sobre os processos de oogénese e espermatogénese em vertebrados. No que diz respeito à quinona reductase, uma vez que é uma enzima de destoxificação poderá desempenhar um papel importante na manutenção da integridade genética da gónada, uma vez que elimina espécies de oxigénio reactivo, resultantes do metabolismo do esteróides, que poderiam causar danos no DNA e

comprometer todo o processo de transcrição. O papel da catepsina na espermatogénese foi já demonstrado, contribuindo para a manutenção e integridade de estruturas indispensáveis à formação dos espermatozóides (Karzai *et al.*, 1992; Wright *et al.*, 2003),

Outro dos objectivos do presente trabalho era a análise da expressão do AR, ER α , ER β 1 e ER β 2 em resposta à 11 KT; no entanto, não ocorreram alterações na expressão de qualquer um dos receptores, nem em resposta à alteração hormonal nem em função da percentagem de testículo na gónada. Deste modo podemos concluir que a análise da expressão dos receptores de esteróides sexuais não é uma boa ferramenta molecular para estudar a diferenciação e/ou inversão sexual, sugerindo-se tal como foi apontado por outro autores, a análise das enzimas esteroideogénicas e eventualmente outros genes novos que ainda estão por identificar e que eventualmente terão crucial importância na diferenciação e desenvolvimento das gónadas.

Em conclusão, os resultados produzidos no presente estudo fornecem informação que pode servir de base para a definição de investigação futura e sugerem novas pistas sobre as vias moleculares envolvidas na actuação dos androgénios.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alam**, M., Komuro, H., Bhandari, R., Nakamura, S., Soyano, K. & Nakamura, M. (2005). Immunohistochemical evidence identifying the site of androgen production in the ovary of the protogynous grouper *Epinephelus merra*. *Cell Tissue Research*. Publicado online.
- Amer**, M. A., Miura, T., Miura, C. & Yamauchi, K. (2001). Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). *Biology of Reproduction* **65**, 1057-1066.
- Amiri**, B.M., Maebayashi, M., Adachi, S. & Yamauchi, K. (1996). Testicular development and serum steroid profiles during the annual sexual cycle of the male sturgeon hybrid, the bester. *Journal of Fish Physiology* **48**, 1039-1050.
- Ansell**, P.J., Espinosa-Nicholas, C., Curran, E.M., Judy, B.M., Philips, B.J., Hannink, M. & Lubahn, D.B. (2004). In vitro and in vivo regulation of antioxidant response element-dependent gene expression by estrogens. *Endocrinology* **145** (1), 311-317.
- Bardet**, P.-L., Horard, B., Robinson-Rechavi, M., Laudet, V. & Vanacker, J.-M. (2002). Characterization of oestrogen receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Molecular Endocrinology* **28**, 153-163.
- Baroiller**, J.-F. (1988). *Étude corrélée de l'apparition des critères morphologiques de la différenciation de la gonade et de ses potentialités stéroïdogènes chez Oreochromis niloticus*. Université Pierre et Marie Curie, Paris.
- Baroiller**, J.-F., Guigen, Y., Iseki, K. & Fostier, A. (1998). Physiological role of androgen on gonadal sex differentiation in two teleosts fish, *Oncorhynchus mykiss* and *Oreochromis niloticus*. *Journal of Experimental Zoology* **281**, 506-507.
- Baroiller**, J.-F., Guigen, Y. & Fostier, A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences* **55**, 910-931.
- Bentvelsen**, F.M., Brinkmann, A.O., van der Schoot, P., van der Linden, J.E., van der Kwast, T.H., Boersma, W.J., Schroder, F.H. & Nijman, J.M. (1995). Developmental pattern and regulation by androgens of androgen receptor expression in the urogenital tract of the rat. *Molecular and Cellular Endocrinology* **113** (2), 245-253.
- Bianco**, N.R., Perry, G., Smith, M.A., Templeton, D.J. & Montano, M.M. (2003). Functional implications of antiestrogen induction of quinone reductase: inhibition of estrogen-induced deoxyribonucleic acid damage. *Molecular Endocrinology* **17** (7), 1344-1355.

- Billard**, R., Breton, B. & Richard, M. (1981). On the inhibitory effect of some steroids on spermatogenesis in adult rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Zoology* **59**, 1479-1487.
- Billard**, R. (1992). Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. *Aquaculture* **100**, 263-298.
- Blanchere**, M., Berthaut, I., Portois, M.C., Mestayer, C. & Mowszowicz, I. (1998). Hormonal regulation of the androgen receptor expression in human prostatic cells in culture. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **66** (5-6), 319-326.
- Blázquez**, M., Zanuy, S., Carrillo, M. & Piferrer, F. (1998). Structural and functional effects of early exposure to estradiol-17 β and 17 α -ethynylestradiol on the gonads of the gonochoristic teleost *Dicentrarchus labrax*. *Fish Physiology and Biochemistry* **18**, 37-47.
- Blum**, J., Knoebel, I., Larkin, P., Kroll, K.J. & Denslow, N.D. (2004). Use of suppressive hybridization and cDNA arrays to discover patterns of altered gene expression in the liver of dihydrotestosterone and 11-ketotestosterone exposed adult male largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Marine Environmental Research* **58**, 565-569.
- Borg**, B. (1994). Androgen in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology* **109C** (3), 219-245.
- Burnstein**, K.L., Maiorino, C.A., Dai, J.L. & Cameron, D.J. (1995). Androgen and glucocorticoid regulation of androgen receptor cDNA expression. *Molecular and Cellular Endocrinology* **115**, 177-186.
- Braun**, A. & Thomas, P. (2003). Androgen inhibits estradiol-17 β synthesis in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) ovaries by a nongenomic mechanism initiated at cell surface. *Biology of Reproduction* **69**, 1642-1650.
- Braunstein**, G. (2001). Testes. In F. Greenspan & D. Gardner (Eds.), *Basic and clinical endocrinology* (6 ed., pp. 422-451). USA: Lange Medical Books/McGraw-Hill.
- Cardwell**, J.R. & Liley, N.R. (1991). Hormonal control of sex and color change in the spotlight parrotfish, *Sparisoma viride*. *General and Comparative Endocrinology* **81**, 7-20.
- Cavaco**, J.E.B. (1998). *Sexual steroid hormones participate in the control of puberty in the male African catfish, Clarias gariepinus*. Universidade de Utrecht, Utrecht.

- Cavaco**, J. E., Vilroxx, C., Trudeau, V. L., Schulz, R. W. & Goos, H. J. (1998). Sex steroids and the initiation of puberty in male African catfish (*Clarias gariepinus*). *American Journal of Physiology* **275**, R1793-1802.
- Cavaco**, J. E., van Blijswijk, B., Leatherland, J. F., Goos, H. J. & Schulz, R. W. (1999). Androgen-induced changes in Leydig cell ultrastructure and steroidogenesis in juvenile African catfish, *Clarias gariepinus*. *Cell and Tissue Research* **297**, 291-299.
- Cavaco**, J.E., Bogerd, J., Goos, H. & Schulz, R.W. (2001). Testosterone inhibits 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biology of Reproduction* **65**, 1807-1812.
- Chan**, Y.-L., Suzuki, K., Olvera, J. & Wool, I.G. (1993). Zinc finger-like motifs in rat ribosomal proteins S27 and S29. *Nucleic Acids Research* **21** (3), 649-655.
- Chang**, C.F., Lau, E.L. & Lin, B.Y. (1995a). Estradiol-17 β suppresses testicular development and stimulates sex change in protandrous black porgy, *Acanthopargus schlegelii*. *Fish Physiology and Biochemistry* **14**, 481-488.
- Chang**, C.F., Lau, E.L. & Lin, B.Y. (1995b). Stimulation of spermatogenesis or of sex change according to the dose of exogenous estradiol-17 β in juvenile males of the protandrous black porgy, *Acanthopargus schlegelii*. *General and Comparative Endocrinology* **100**, 355-367.
- Chang**, X., Kobayashi, T., Todo, T., Ikeuchi, T., Yaoshiura, Y., Kajiura-Kobayashi, H., Morrey, C. & Nagahama, Y. (1999). Molecular cloning of estrogen receptors α and β in the ovary of a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Zoological Science* **16**, 653-658.
- Chaves-Pozo**, E., Mulero, V., Meseguer, J. & Ayala, A.G. (2004) An overview of cell renewal in the testis throughout the reproductive cycle of a seasonal breeding teleost, the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Biology of Reproduction* **72**(3), 593-601.
- Chevassus**, B. (1998). *Modification du phénotype sexuel et du mode de reproduction chez les poissons salmonidés: inversion sexuelle hormonale, gynogenèse, hybridation interspécifique et polyploïdisation*. Université de Paris XI, Orsay.
- Christiansen**, C. (1990). Hormonal prevention and treatment of osteoporosis - state of the art. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **37**, 447-449.
- Clark**, J.H. & Markaverich, B.M. (1988). Action of ovarian steroid hormones. In E. Knobil & S. Neill (Eds.), *The Physiology of Reproduction* (pp. 675-724). New York: Raven Press.

- Condeça**, J. A. B. & Canario, A. V. M. (1995). Steroidogenesis during estrogen-induced sex inversion in the seabream, *Sparus aurata*. In *Proceeding of the Fifth International Simposium of the Reproductive Physiology of Fish*, Abstr.: 306, Goetz F. and Thomas, P. (eds.), Austin, Texas, 2-8 July.
- Condeça**, J. A. B. & Canario, A. V. M. (1999). The effect of estrogen on the gonads and on *in vitro* conversion of androstenedione to testosterone, 11-ketotestosterone and estradiol-17 β in *Sparus aurata* (Teleostei, Sparidae). *General and Comparative Endocrinology* **116**, 59-72.
- Conover**, D.O. (1984). Adaptative significance of temperature-dependent sex determination in a fish. *The American Naturalist* **123**, 298-313.
- Crews**, D. (1994). Temperature, steroids and sex determination. *Journal of Endocrinology* **142**, 1-8.
- Dai**, J.L. & Burnstein, K.L. (1996). Two androgen response elements in the androgen receptor coding region are required for cell-specific up-regulation of receptor messenger RNA. *Molecular Endocrinology* **10** (12), 1582-1594.
- D'Cotta**, H., Fostier, A., Guigen, Y., Govoroun, M. & Baroiller, J.-F. (2001). Search for genes involved in the temperature-induced gonadal sex differentiation in the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Experimental Zoology* **290**, 574-585.
- Debes**, J.D. & Tindall, D.J. (2002). The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer. *Cancer Letters* **187**, 1-7.
- Drengler**, S.M., Handa, R.J. & Jones, K.J. (1997). Effects of axotomy and testosterone on androgen receptor mRNA expression in hamster facial motoneurons. *Experimental Neurology* **146** (2), 374-379.
- Driessen**, C., Bryant, R.A.R., Lennon-Duménil, A.M., Villadangos, J.A., Bryant, P.W., Shi, G.P., Chapman, H.A. & Ploegh, H.L. (1999) Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells. *Journal of Cell Biology* **147**, 775-790.
- Ebling**, F.J.P., Brooks, A.N., Cronin, A.S., Ford, H. & Keer, J.B. (2000). Estrogenic induction of spermatogenesis in the hypogonadal mouse. *Endocrinology* **141**, 2861-2869.
- Eddy**, E., Washburn, T., Bunch, D., Goulding, E., Gladen, B., Libahn, D. & Korach, K. (1996). Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* **137**, 4796-4805.
- Evans**, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**, 889-895.

- Fernandez-Pol**, J.A. (1996). Metallopanstimulin as a novel tumor marker in sera of patients with various types of common cancers: implications for prevention and therapy. *Anticancer Research* **16 (4B)**, 2177-2185.
- Fernandez-Pol**, J.A., Fletcher, J.W., Hamilton, P.D. & Klos, D.J. (1997). Expression of metallopanstimulin and oncogenesis in human prostatic carcinoma. *Anticancer Research* **17 (3A)** 1519-1530.
- Fostier**, A., Jalabert, B., Billard, R., Breton, B. & Zohar, Y. (1983). The gonadal steroids. In W.S. Hoar, D.J. Randall & E.M. Donaldson (Eds), *Fish physiology*, vol. 9A (pp. 277-372). New York: Academic Press.
- Gardner**, D. (2001). Mechanisms of hormone action. In F. Greenspan & D. Gardner (Eds.), *Basic and clinical endocrinology* (6 ed., pp. 59-79). USA: Lange Medical Books/McGraw-Hill.
- Godwin**, J.R. & Thomas, P. (1993). Sex change and steroid profiles in the protandrous anemone fish, *Amphiprior melanopus* (Pomacentridae, Teleostei). *General and Comparative Endocrinology* **91**, 145-157.
- Goldfien**, A. (2001). Ovaries. In F. Greenspan & D. Gardner (Eds.), *Basic and clinical endocrinology* (6 ed., pp. 453-505). USA: Lange Medical Books/McGraw-Hill.
- Grad**, J.M., Dai, J.L., Wu, S. & Burnstein, K.L. (1999). Multiple androgen response elements and a Myc consensus site in the androgen receptor (AR) coding region are involved in androgen-mediated up-regulation of AR messenger RNA. *Molecular Endocrinology* **13 (11)**, 1896-1911.
- Green**, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A. & Chambon, P. (1986). Cloning of the human oestrogen receptor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **24**, 77-83.
- Guigen**, Y., Baroiller, J.F., Ricordel, M.J., Iseki, K., Mcmeel, O.M., Martin, S.A. & Fostier, A. (1999). Involvement of estrogens in the process of sex differentiation of two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Molecular Reproduction and Development* **54 (2)**, 154-162.
- Hanke**, H., Lenz, C., Hess, B., Spindler, K.D. & Weidemann, W. (2001). Effect of testosterone on plaque development and androgen receptor expression in the arterial vessel wall. *Circulation* **103 (10)**, 1382-1385.
- Happe**, A. & Zohar, Y. (1988). Self-fertilization in the protandrous hermaphrodite *Sparus aurata*: development of the technology. In Y. Zohar & B. Breton (Eds), *Reproduction in fish. Basic and applied aspects in endocrinology and genetics* (pp. 177-180). Tel-Aviv, Israel: INRA, Paris.

- Jänne**, O. A., Palvimo, J. J., Kallio, P., & Mehto, M. (1993). Androgen receptor and mechanism of androgen action. *Annals of Medicine* **25**, 83-89.
- Jensen**, E.V. (1991). Overview of the nuclear receptor family. In *Nuclear Hormone Receptors. Molecular Mechanisms, Cellular Functions, Clinical Abnormalities* (ed. M.G. Parker), pp 1-13. London: Academic Press.
- Jiang**, F., & Wang, Z. (2003). Identification of androgen-responsive genes in the rat ventral prostate by complementary deoxyribonucleic acid subtraction and microarray. *Endocrinology* **144** (4), 1257-1265.
- Jian**, J.-Q., Kobayashi, T., Ge, W., Kobayashi, H., Tanaka, M., Okamoto, M., Nonaka, Y. & Nagahama, Y. (1996). Fish testicular 11 β -hydroxylase: cDNA cloning and mRNA expression during spermatogenesis. *FEBS Letter* **397**, 250-252.
- Karzai**, A.W. & Wright, W.W.(1992). Regulation of the synthesis and secretion of transferrin and cyclic protein-2/cathepsin L by mature rat Sertoli cells in culture. *Biology of Reproduction* **47**(5):823-31
- Kawamura**, T., Omura, S., Sakai, S. & Yamashita, I. (2003). No effects of estrogen overexpression on gonadal sex differentiation and reversal in medaka fish. *Zoological Science* **20** (1), 43-47.
- Kim**, S.J., Ogasawara, K., Park, J.G., Takemura, A. & Nakamura, M. (2002). Sequence and expression of androgen receptor and estrogen receptor gene on the sex type of protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. *General and Comparative Endocrinology* **127**, 165-173.
- Kime**, D. E. (1987). The steroids. In I. Chester-Jones, P. Ingleton & J. Phillips (Eds.), *Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology* (pp. 3-56). New York: Plenum Press.
- Kime**, D.E., Lone, K.P. & Al-Marsouk, A. (1991). Seasonal changes in serum steroid hormones in a protandrous teleost, the sobaity (*Sparidentex hasta* Valenciennes). *Journal of Fish Biology* **39**, 745-753.
- Kirschke**,H., Wiederanders,B., Brömme,D. & Rinne,A. (1989). Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochemical Journal* **264**, 467-473.
- Kishida**, M., Tyler, W. A. & Specker, J. L. (1995). Changes in plasma estradiol and testosterone concentrations during a brooding cycle of female mouthbrooding tilapia, *Oreochromis mossambicus*, and male mouthbrooding tilapia, *Sarotherodon melanotheron*. In F.W. Goetz & P. Thomas (Eds.), *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish* (pp 230). Austin, Texas, USA.

- Kreitmann, B. & Bayard, F.** (1979). Androgen interaction with oestrogen receptor in human tissues. *Journal of Steroid Biochemistry* **11**, 1589-1595.
- Kroon, F.J. & Liley, N.R.** (2000). The role of steroid hormones in protogynous sex change in the blackeye goby, *Coryphopterus nicholsii* (Teleostei: Gobiidae). *General and Comparative Endocrinology* **118** (2), 273-283.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, J.-A.** (1996). Cloning a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 5925-5930.
- Kusakabe, M., Kobayashi, T., Todo, T., Lokman, P.M., Nagahama, Y. & Young, G.** (2002). Molecular cloning and expression during spermatogenesis of a cDNA encoding testicular 11 β -hydroxylase (P450_{11 β}) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Reproduction and Development* **62**, 456-469.
- Lapointe, J., Labrie, C.** (1999). Identification and cloning of a novel androgen-responsive gene, uridine diphosphoglucose dehydrogenase, in human breast cancer cells. *Endocrinology* **140** (10) 4486-4493.
- Lee, Y.-H., Lee, F.-Y., Yueh, W.-S., Tacon, P., Ju, J.-L., Chang, C.-N., Jeng, S.-R., Tanaka, H. & Chang, C.-F.** (2000). Profiles of gonadal development, sex steroids, aromatase activity, and gonadotropin II in the controlled sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii* Bleeker. *General and Comparative Endocrinology* **199**(1), 111-120.
- Lee, Y.-H., Du, J.-L., Yueh, W.-S., Lin, B.-Y., Huang, J.-D., Lee, C.-Y., Lee, M.-F., Lau, E.-L., Lee, F.-Y., Morrey, C., Nagahama, Y. & Chang, C.-F.** (2001). Sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*: a review in gonadal development, estradiol, estrogen receptor, aromatase activity and gonadotropin. *Journal of Experimental Zoology* **290**, 715-726.
- Lee, D., & Chang, C.** (2002). Molecular communication between androgen receptor and general transcription machinery. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **84**, 41-49.
- Lichtman, R.** (1996). Perimenopausal and postmenopausal hormone replacement therapy. Part 1. An update of the literature on benefits and risks. *Nurse Midwifery* **41**, 3-28.
- Lieberman, A.P., Friedlich, D.L., Harmison, G., Howell, B.W., Jordan, C.L., Breddlove, S.M. & Fischbeck, K.H.** (2001). Androgens regulate the mammalian homologues of invertebrate sex determination genes *tra-2* and *fox-1*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **282**, 499-506.

- Lindsey**, J.S. & Wilkinson, M.F. (1996). An androgen-regulated homeobox gene expressed in rat testis and epididymis. *Biology of Reproduction* **55** (5), 975-983.
- Liu**, S., Govoroun, M., D'Cotta, H., Ricordel, M.-J., Lareyre, J.-J., McMeel, O.M., Smith, T., Nagahama, Y. & Guigen, Y. (2000). Expression of cytochrome P45011 β (11 β -hydroxylase) gene during gonadal sex differentiation and spermatogenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **75**, 291-298.
- Liu**, W. & Spero, D.M. (2004). Cysteine protease cathepsin S as a key step in antigen presentation. *Drug News Perspect* **17**(6), 357-363.
- Lufkin**, E.G., Wahner, H.W., O'Fallon, W.M., Hodgson, S.F., Kotowicz, M.A., Lane, A. W., Judd, H.L., Caplan, R.H. & Riggs, B.L. (1992). Treatment of postmenopausal osteoporosis with transdermal estrogen. *Annals of Intern Medicine* **117**, 1-9.
- Ma**, C.H., Dong, K.W. & Yu, K.L. (2000). cDNA cloning and expression of a novel estrogen receptor β -subtype in goldfish (*Carassius auratus*). *Biochimica et Biophysica Acta* **1490**, 145-152.
- McDonnell**, D.P., Clevenger, B., Dana, S., Santiso-Mere, D., Tzukerman, M.T. & Gleeson, M.A.G. (1993). The mechanism of action of steroid hormones: a new twist to an old tale. *The Journal of Clinical Pharmacology* **33**, 1165-1172.
- Mayer**, I., Schmitz, M., Borg, B. & Schulz, R. (1992). Seasonal endocrine changes in male and female Arctic charr (*Salvenius alpinus*). I. Plasma levels of three androgens, 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone, and 17 β -estradiol. *Canadian Journal of Zoology* **70**, 37-42.
- McInerney**, E.M., Weis, K.E., Sun, J., Mosselman, S. & Katzenellenbogen, B.S. (1998). Transcription activation by the human estrogen receptor subtype β (ER β) studied with ER β and ER α receptor chimeras. *Endocrinology* **139** (11), 4513-4522.
- McKay**, L.I. & Cidlowski, J.A. (1999). Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid-signaling pathways. *Endocrine Reviews* **20** (4), 435-439.
- Miura**, T., Yamauchi, K., Takahashi, H. & Nagahama, Y. (1991). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 5774-5778.

- Miura**, T., Miura, C., Ohta, T., Nader, M.R., Todo, T. & Yamauchi, K. (1999). Estradiol-17 β stimulates the reweal of spermatogonial stem cells in males. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **264**, 230-234.
- Mobbs**, B.G., Johnson, I.E. & Liu, Y. (1990). Quantitation of cytosolic and nuclear estrogen and progesterone receptor in benign, untreated, and treated malignant human prostatic tissue by radioligand binding and enzymeimmunoassays. *Prostate* **16**, 235-244.
- Montano**, M.M., Wittmann, B.M. & Bianco, N.R. (2000). Identification and characterization of a novel factor that regulates quinone reductase gene transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry* **274** (449), 34306-34313.
- Mosselman**, S., Polman, J. & Dijkema, R. (1996). ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters* **392**, 49-53.
- Mylonas**, C.C., Scott, A.P., Vermeirssen, E. L. M. & Zohar, Y. (1997). Changes in plasma gonadotropin II and sex steroid hormones, and sperm production in striped bass after treatment with controlled-release gonadotropin-releasing hormone agonist delivery-systems. *Biology of Reproduction* **57**, 669-675.
- Nabulsi**, A.A., Folsom, A.R., White, A., Patsch, W., Heiss, G., Wu, K.K. & Szklo M.(1993). Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. The Atherosclerosis Risk in Communities Study Investigators. *The New England Journal of Medicine* **328**(15),1069-1075
- Nader**, M. R., Miura, T., Ando, N., Miura, C. and Yamauchi, K. (1999). Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates all stages of 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, *in vitro*. *Biology of Reproduction* **61**, 944-947.
- Nakamura**, M., Hourigan, T.F., Yamauchi, K., Nagahama, Y. & Grau, E.G. (1989). Histological and ultrastructural evidence for the role of gonadal steroid hormones in sex change in the protogynous wrasse *Thalassoma duperrey*. *Environmental Biology of Fishes* **24**, 117-136.
- Nelson**, P.S., Clegg, N., Arnold, H., Ferguson, C., Bonham, M., White, J., Hood, L., & Lin, B. (2002). The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium. *PNAS* **99** (18), 11890-11895.
- Nioi**, P. & Hayes, J.D. (2004). Contribution of NADP(H):quinone reductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. *Mutation Research* **555** (1-2), 146-171.

- Ntai**, C., Polycarpou, A. & Tsatsoulis, A. (2003). Molecular epidemiology of the prostate cancer: androgens and polymorphisms in androgen-related genes. *European Journal of Endocrinology* **149**, 469-477.
- Ogawa**, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y. & Muramatsu, M. (1998). The complete primary structure of human estrogen receptor β (hER β) and its heterodimerization with ER α *in vivo* and *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **243**, 122-126.
- Pinto**, P.I.S., Passos, A.L., Martins, R.S. & Canario, A.V.M. (s/d). Seabream (*Sparus aurata*) estrogen receptor 2b: expression, functional characterization and polymorphism. (submitted to *General and Comparative Endocrinology*)
- Piferrer**, F., Baker, I. J. & Donaldson, E. M. (1993). Effects of natural, synthetic, aromatizable, and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *General and Comparative Endocrinology* **91**, 59-65.
- Plymate**, S.R., Tennant, M.K., Culp, S.H., Woodke, L., Marcelli, M., Colman, I. Nelson, P.S., Carroll, J.M., Roberts, C.T. Jr. & Ware, J.L. (2004). Androgen receptor (AR) expression in AR-negative prostate cancer cells results in differential effects of DHT and IGF-I on proliferation and AR activity between localized and metastatic tumors. *Prostate* **61**(3), 276-290.
- Podgorski**, I. & Sloane, B.F. (2003). Cathepsin B and its role(s) in cancer progression. *Biochemical Society Symposium* **70**, 263-276.
- Porterfield**, S. (2001). Introduction to the endocrine system. In S. Porterfield (Ed.), *Endocrine physiology* (2nd edition ed.). St. Louis: Mosby.
- Pratt**, W.B., Galigniana, M.D., Morishima, Y. & Murphym P.J. (2004). Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays in Biochemistry* **40**, 41-48.
- Revenkova**, E., Masson, J., Koncz, C., Afsar, K., Jakovleva, L. & Paszkowski, J. (1999). Involvement of Arabidopsis thaliana ribosomal protein S27 in mRNA degradation triggered by genotoxic stress. *The EMBO Journal* **18** (2), 490-499.
- Rinchard**, J., Dabrowski, K., Garcia-Abiado, M. A. & Ottobre, J. (1999). Uptake and depletion of plasma 17 α -methyltestosterone during induction of masculinization in muskellunge, *Esox masquinongy*: effect on plasma steroids and sex reversal. *Steroids* **64**, 518-525.
- Roberts**, C.T. Jr. (2004). IGF-1 and prostate cancer. *Novartis Found Symposium* **262**, 193-199.

- Robinson-Rechavi**, M., Garcia, H., & Laudet, V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell Science* **116**, 585-586.
- Rosano**, G.M., Chierchia, S.L., Leonardo, F., Beale, C.M. & Collins P. (1996). Cardioprotective effects of ovarian hormones. *European Heart Journal* **D**, 15-19.
- Rothbard**, S., Levavi-Sivan, B. & Yaron, Z. (1996). Breeding behaviour and the associated GtH steroid levels in female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Polish Archives of Hydrobiology* **44**, 83-92.
- Rowell**, C.B., Watts, S.A., Wibbels, T., Hines, G.A. & Mair, G. (2002). Androgen and estrogen metabolism during sex differentiation in mono-sex population of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *General and Comparative Endocrinology* **125**, 151-162.
- Saunders**, P.T.K., Millar, M.R., MacPherson, S., Irvine, D.S., Groome, N.P., Evans, L.R., Sharpe, R.M. & Scobie, G.A. (2002). ER β 1 and the ER β 2 Variant (ER β cx/ β 2) are expressed in distinct cell populations in the adult human testis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **87(6)**, 2706-2715.
- Saidapur**, S.K., Gramapurohit, N.P. & Shanbhag, B.A.(2001). Effect of sex steroids on gonadal differentiation and sex reversal in the frog, *Rana curtipes*. *General and Comparative Endocrinology* **124(1)**, 115-123
- Schulz**, R.W., Vischer, H.F., Cavaco, J.E.B., Santos, E.M., Tyler, C.R., Goos, H.J.Th. & Bogerd, J. (2001). Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* **129**, 407-417.
- Scott**, A.P. & Canario, A.V.M. (1992). 17 α ,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one 20-sulphate: a major new metabolite of the teleost oocyte maturation-inducing steroid. *General and Comparative Endocrinology* **85**, 91-100.
- Segawa**, T., Nau, M.E., Xu, L.L., Chilikuri, R.N., Makarem, M., Zhang, W., Petrovics, G., Sesterhenn, I.A., McLeod, D.G., Moul, J.W., Vahey, M., & Srivastava, S. (2002). Androgen-induced expression of endoplasmic reticulum (ER) stress response genes in prostate cancer cells. *Oncogene* **21**, 8749-8758.
- Seki**, M., Yokota, H., Matsubara, H., Maeda, M., Tadokoro, H. & Kobayashi, K. (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **23(3)**, 774-781.

- Shan**, L.X., Bardin, C.W. & Hardy, M.P. (1997). Immunohistochemical analysis of androgen effects on androgen receptor expression in developing Leydig and Sertoli cells. *Endocrinology* **138** (3), 1259-1266.
- Shapiro**, D.Y. (1992). Plasticity of gonadal development and protandry in fishes. *Journal of Experimental Zoology* **261**, 194-203.
- Sharpe**, R.M. (1998). The role of estrogens in the male. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **9**, 371-377.
- Shi**,G.P., Munger,J.S., Meara,J.P., Rich,D.H. & Chapman,H.A. (1992) Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 7258-7262.
- Shi**,G.P., Webby, A. C., Fostefl, K. E. ; Knoll, J. H. M.; Lemere, C. A., Munger, J. S. ; & Chapman, H. A. (1994). Human Cathepsin S: Chromosomal Localization, Gene Structure, and Tissue Distribution. *Journal of Biological Chemistry* **269** (15), 11530-11536.
- Shi**,G.P., Sukhova,G.K., Kuzuya,M., Ye,Q., Du,J., Zhang,Y., Pan,J.H., Lu,M.L., Cheng,X.W., Iguchi,A., Perrey,S., Lee,A.M., Chapman,H.A. & Libby,P. (2003). Deficiency of the cysteine protease cathepsin S impairs microvessel growth. *Circulation Research* **92**, 493-500.
- Shupnik**, M.A. (1996). Gonadal hormone feedback on pituitary gonadotropin genes. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **7**, 272-276.
- Socorro**,S., Power, D. & Canário, A.V.M. (2000). Expression of two estrogen receptors during induced sex reversal in seabream. In (B. Norberg, O.S. Kjesbu, G.L., Taranger, E., Andersson, S.O. Stefansson (Eds.), *Reproductive Physiology of Fish* (pp. 237-240) Bergen: University of Bergen.
- Socorro**, S. (2001). *Cloning and characterisation of seabream (*Sparus aurata*) estrogen receptors*. Universidade de Faro, Faro.
- Staub**, N.L. & De Beer, M. (1997). The role of androgens in female vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* **108**, 1-24.
- Suzuki**, K., Ito, K., Kurokawa, K., Suzuki, T., Shimizu, N., Fukabori, Y., Honma, S. & Yamanaka, H. (1997). Expression and degradation of rat androgen receptor following castration, testosterone replacement and antiandrogen administration: analysis by Western blot and immunohistochemistry. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* **183** (3), 159-172.

- Tchoudakova**, A., Pathak, S. & Callard, G.V. (1999). Molecular cloning of an estrogen receptor β subtype from the goldfish, *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology* **113**, 388-400.
- Thomas**, E.A., Alvarez, C.E. & Stuclyffe, J.G. (2000). Evolutionary distinct classes of S27 ribosomal proteins with differential mRNA expressions in rat hypothalamus. *Journal of Neurochemistry* **74** (6), 2259-2267.
- Tsay**, M.-J. & O'Malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual Reviews of Biochemistry* **63**, 451-486.
- Turner**, R.T., Riggs, B.L. & Spelsberg, T.C. (1994). Skeletal effects of estrogen. *Endocrine Reviews* **15**, 275-296.
- Ueda**, H., Nagahama, Y., Tashiro, F. & Crim, L.W. (1983). Some endocrine aspects of precocious sexual maturation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*. *Bulletin of the Japanese Society of Science Fish* **49**, 587-597.
- Warner**, R.R. (1988). Sex change in fishes: hypotheses, evidences and objections. *Environmental Biology of Fishes* **22**, 81-90.
- Wright**, W.W., Smith, L., Kerr, C. & Charron, M. (2003). Mice that express enzymatically inactive cathepsin L exhibit abnormal spermatogenesis. *Biology of Reproduction* **68** (2), 608-687.
- Xia**, Z., Patiño, R., Gale, W.L., Maule, A.G. & Densmore, L.D. (1999). Cloning, in vitro expression, and novel phylogenetic classification of a channel catfish estrogen receptor. *General and Comparative Endocrinology* **113**, 360-368.
- Yamamoto**, T. (1969). Sex differentiation. In *Fish Physiology*, vol. III eds. W. S. Hoar D. J. Randall and E. M. Donaldson), pp. 117-175. New York: Academic Press.
- Young**, G., Thorarensen, H. & Davie, P. S. (1996). 11-Ketotestosterone suppresses interrenal activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* **103**, 301-307.
- Zappa**, F., Ward, T., Butler, T., Pedrinis, E. & McGown, A. (2001). Overexpression of NADP(H):quinone reductase 1 in human reproductive system. *The Journal of Histochemistry & Citochemistry* **49** (9), 1187-1188.
- Zhou**, Q., Shima, J.E., Nie, R., Friel, P.J. & Griswold, M.D. (2005). Androgen-regulated transcripts in the neonatal mouse testis as determined through microarray analysis. *Biology of Reproduction* **72**, 1010-1019.

ANEXO I

Água tratada com DEPC

Adicionar DEPC a água bidestilada numa concentração final de 0,1%. Incubar durante a noite, com agitação, à temperatura ambiente e autoclavar durante 30 minutos para remover vestígios de DEPC.

Tampão 10xTAE

48,4g de Tris base
11ml de ácido acético glacial
20 ml EDTA 0.5M (pH 8.0)
Juntar a aproximadamente 800 ml de água bi-destilada e agitar até dissolução completa. Juntar água até perfazer 1 L e autoclavar.

LB Agar

Pesar 20 g do preparado LB Agar comercial e adicionar a 800 ml de água destilada. Dissolver e perfazer o volume para 1 L. Autoclavar.

LB Broth

Pesar 20 g do preparado LB Broth comercial e adicionar a 800 ml de água destilada. Dissolver e perfazer o volume para 1L. Autoclavar.

MOPS 10x

20.9 g MOPS
2.05 g acetato de sódio anidro
10 ml EDTA 0.5M
Juntar água DEPC estéril até perfazer um volume final de 500 ml, ajustar pH a 7.0 com NaOH concentrado. Não autoclavar. Guardar ao abrigo da luz.

SSC 20x

175.3 g NaCl
88.2 g Citrato sódio
Dissolver em 800 ml de água bi-destilada. Ajustar o pH a 7.0 com NaOH 10N e perfazer o volume até 1 L. Autoclavar.

Denhart's 50x

1% Albumina Sérica Bovina

1% Ficoll 400 (5g-500ml)

1% Polivinilpirrolidona (5g-500ml)

Filtrar, esterilizar e armazenar em alíquotas (15ml) a – 20 °C.

Usar água destilada estéril.

TB

10 mM PIPES

55mM MnCl₂

15 mM CaCl₂

250 mM KCl

Adicionar o MnCl₂ depois de acertar o pH da solução a 6.7 com KOH (não com NaOH). Não autoclavar esta solução, filtrar e guardar a 4°C

SOB

2% Bacto Triptona

0,5% Yeast Extract (*FM 29*)

10 mM de NaCl

2,5 mM de KCl

10mM de MgCl₂

10 mM de MgSO₄

Juntar água bi-destilada até perfazer um volume final de 1 L. Autoclavar

ANEXO II

Preparação de bactérias competentes

Inocular 250 ml de meio SOB num erlenmeyer de 2 L com 10 a 12 colônias XL1-Bleu MRF' e incubar "overnight" a 18 °C com agitação (200-250rpm) até $A_{600}=0,6$. Incubar as células 10 minutos em gelo e centrifugar a 2500g, a 4 °C, durante 10 minutos. Descartar o sobrenadante e ressuspender suavemente, por inversão, em 80 ml de TB frio; incubar em gelo durante 10 minutos. Centrifugar a 2500 rpm a 4 °C, durante 10 minutos, retirar o sobrenadante e ressuspender, por inversão, o pellet em 20 ml de TB frio. Adicionar DMSO até uma concentração final de 7%. Incubar em gelo durante 10 minutos. Fazer alíquotas de 100 µl e congelar em azoto líquido imediatamente. Guardar as alíquotas a -80 °C.

Preparação de placas de LB agar IPTG/X-Gal/ampicilina

Adicionar 37 g de LB agar comercial a 1 L de água destilada. Autoclavar e deixar arrefecer até 55°C antes de adicionar a ampicilina numa concentração final de 100 µg/ml. Depois suplementar o meio com IPTG de modo a obter uma concentração de 0.5 mM IPTG, juntar 80 µg/ml X-Gal (100µl/100ml), e distribuir o meio por placas de Petri.